

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(11) 13

(1)

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-85703

(43) 公開日 平成8年(1996)4月2日

(51) Int.Cl. ^c	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 08 E 37/00	G	7433-4C		
	D	7433-4C		
	K	7433-4C		
A 61 K 47/36	B			
C 08 B 37/02		7433-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 5 FD (全 42 頁) 最終頁に続く

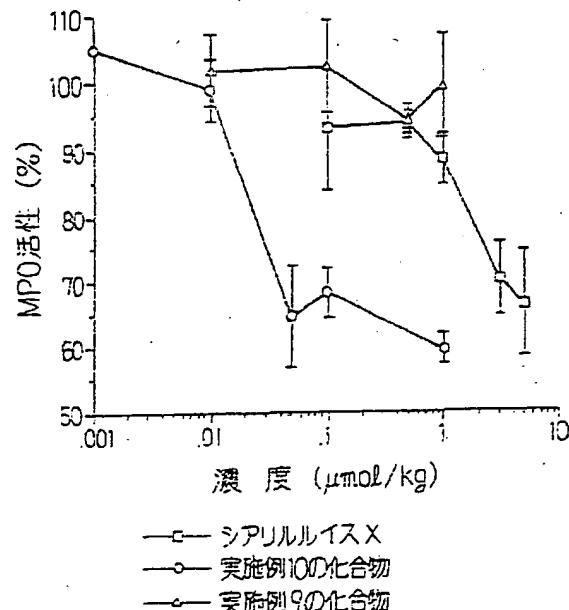
(21) 出願番号	特願平6-248538	(71) 出願人	390031462
(22) 出願日	平成6年(1994)9月16日		株式会社ディ・ティ・エス研究所 東京都渋谷区渋谷2丁目17番5号
		(72) 発明者	坂上昌浩 千葉県柏市明原4-4-4 インペリアル レジデンス102
		(72) 発明者	堀江和敏 千葉県流山市美原一丁目1232-2 ベルク レール江戸川台207
		(72) 発明者	蛭正晃徳 千葉県柏市千代田3-8-7 ヴィヌス柏 203
		(74) 代理人	弁理士 佐藤一雄 (外2名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 臓器移行性を有する多糖誘導体および薬物担体

(57) 【要約】

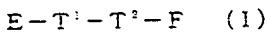
【構成】 下記一般式(I)で表される化合物。
 $E - T^1 - T^2 - F \quad (I)$ (上記式中、Eは単糖もしくはその誘導体、またはこれらの2~6個からなるオリゴ糖を表し、T¹は-CH₂、CH₂(OCH₂CH₂)_m-、-(CH₂)_n-等を表し、T²は-NH-、-NHCO-、-CONH-または-NHC(=O)-NH-を表し、Fは多糖またはその誘導体を表す)

【効果】 上記化合物は臓器移向性を示す。従って、抗腫瘍剤等を搬送する薬物担体として用いることができる。



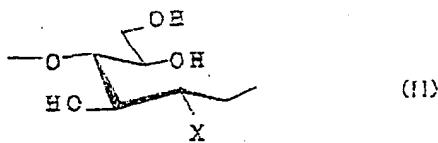
【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(I)に記載の化合物。



(上記式中、Eは、グルコース、フルクトース、マンノース、フコース、ノイラミン酸、ウロン酸、ガラクトサミン、グルコサミン、リボース、デオキシリボース、アラビノースおよびキシロースから選択される单糖、もしくはこれら单糖のN-もしくはO-アシル誘導体、O-アルキル誘導体もしくはエステル誘導体を表すか、またはこれら单糖もしくは单糖の誘導体の2~6個からなるオリゴ糖を表し、T¹は、-CH₂CH₂(OCH₂C_{H₂})_m- (mは、1~10の整数を表す)、-(CH₂)_n- (nは、2~16の整数を表す)または下記基(II)を表し、

【化1】



(上記基中、Xは、-NHCOCH₃、-OHまたは-NH₂を表す)

T²は、-NH-、-NHCO-、-CONH-または-NHCONH-を表し、Fは、キトサン、ブルラン、デキストラン、マンノグルカン、ヘパリン、ヒアルロン酸、およびコンドロイチン硫酸から選択される多糖またはこれら多糖の誘導体を表す)

【請求項2】 Eが、グルコース、マンノース、ガラクトース、フコース、ノイラミン酸、ガラクトサミン、グルコサミン、シアル酸、N-アセチルガラクトサミンおよびN-アセチルグルコサミンから選択される单糖もしくは单糖の誘導体、またはこれら单糖もしくは单糖の誘導体の2~4個からなるオリゴ糖を表し、

Fが、カルボキシメチルキトサンまたはカルボキシメチルブルランを表す、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】 薬物担体である、請求項1または2に記載の化合物。

【請求項4】 多糖の誘導体が医薬化合物を担持してなるものである、請求項1~3に記載の化合物。

【請求項5】 前記医薬化合物が、メトレキサート、ドキソルビシン、デキサメタゾン、インドメタシンから選択されるものである、請求項4に記載の化合物。 40

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、臓器移行性を有する新規な化合物および薬物担体に関する。

【0002】 背景技術

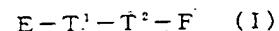
近年、多糖型水溶性高分子を担体として利用し、これに 50

薬物を化学結合させて特定器官へ薬物送達を行う試みがなされている。このような薬物担体としては、例えば、特願平4-234846号、PCT/JP94/00322号、WO92/14759号に記載されるものが挙げられ、これらは、他器官において副作用を有する薬物または腫瘍における薬効の発現に限界のある薬物を効率的に腫瘍に送達することができる。しかしながら、これらは、部位特異的移行性、特に臓器移行性、に関しては、更に改善の余地を残すものであった。一方、臓器移行性と関連して、シアリルルイスXがELAM-1と結合すること(Phillips, M.L., et al. (1990) Science 250, 1130-1132)、好中球にシアリルルイスXが存在し、ELAM-1と反応すること(Bevilacqua, M.P., et al. (1989) Science 243, 1160-1165)およびシアリルルイスXが好中球浸潤を抑制すること(Mulligan, M.S., et al. (1993) J. Exp. Med. 178, 623-631)が知られている。

【0003】

【発明の概要】 従って、本発明は、臓器指向性を示す薬物担体を提供することをその目的とする。

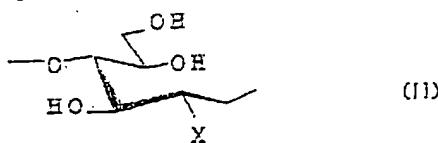
【0004】 本発明による化合物および薬物担体は、下記一般式(I)で表されるものである。



(上記式中、Eは、グルコース、フルクトース、マンノース、フコース、ノイラミン酸、ウロン酸、ガラクトサミン、グルコサミン、リボース、デオキシリボース、アラビノースおよびキシロースから選択される单糖、もしくはこれら单糖のN-もしくはO-アシル誘導体、O-アルキル誘導体もしくはエステル誘導体を表すか、またはこれら单糖もしくは单糖の誘導体の2~6個からなるオリゴ糖を表し、T¹は、-CH₂CH₂(OCH₂C_{H₂})_m- (mは、1~10の整数を表す)、-(CH₂)_n- (nは、2~16の整数を表す)または下記基(II)を表し、

【0005】

【化2】



(上記基中、Xは、-NHCOCH₃、-OHまたは-NH₂を表す) T²は、-NH-、-NHCO-、-CONH-または-NHCONH-を表し、Fは、キトサン、ブルラン、デキストラン、マンノグルカン、ヘパリン、ヒアルロン酸、およびコンドロイチン硫酸から選択される多糖またはこれら多糖の誘導体を表す)

【0006】

【発明の具体的な説明】

一般式(I)の化合物

前記一般式(I)において、Eは、グルコース、フルク

トース、マンノース、フコース、ノイラミン酸、ウコン酸等のヘキソース、ガラクトサミン、グルコサミン等のヘキソサミン、リボース、デオキシリボース、アラビノース、キシロース等のペントースから選択される单糖を表すか、またはこれら单糖の2~6個からなるオリゴ糖を表す。ここで单糖はその誘導体であってもよく、上記单糖のN-またはO-アシル誘導体、O-アルキル誘導体、硫酸、リン酸等とのエステル誘導体などが挙げられる。

【0007】これら誘導体の具体例としては、ノイラミン酸のN-および/またはO-アシル誘導体であるシアル酸（例えば、N-アセチルノイラミン酸）、ヘキソサミンのN-アシル誘導体であるN-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノースの6位水

酸基がリン酸化されたマンノース-6-リン酸、ガラクトースの3位が硫酸化されたガラクトース-3-硫酸、グルコースの6位がベンゾイル化された6-O-ベンゾイルグルコース、N-アセチルグルコサミンの6位の水酸基がカルボキシメチル化された6-O-カルボキシメチル-N-アセチルグルコサミン、グルコサミンの2位のアミノ基がモノベンジル化された2-N-ベンジル-2-グルコサミン等が挙げられる。

【0008】オリゴ糖とは、2~6個（好ましくは2~4個）の上記单糖または单糖誘導体から構成される直鎖状または分枝状のヘテロオリゴマーまたはホモオリゴマーをいう。このようなオリゴ糖としては、例えば、シュークロース、シリルルイスA、シリルルイスX、ラクトース、マルトース、ルイスX、硫酸化ルイスX等が挙げられる。ここで「单糖」および「オリゴ糖」とは、その糖分子が有する水酸基（好ましくはアノマリー位の水酸基）の水素原子が一つ除かれたものを意味するものとする。

【0009】一般式(I)において、EとT¹とは、O-α-グリコシド結合またはO-β-グリコシド結合によって結合しているが、結合はこのいずれであってもよい。

【0010】T¹においてmは1~10の整数を表し、好ましくは2~5である。また、nは2~16の整数を表し、好ましくは2~8である。T¹が前記基(II)を表す場合に、基(II)の好ましい例としては、Xが水酸基またはアセトアミド基であるもの、が挙げられる。

【0011】前記一般式(I)においては、Fは、キトサン、ブルラン、デキストラン、マンノグルカン、ヘパリン、ヒアルロン酸およびコンドロイチン硫酸等の多糖を表すが、これら多糖はその誘導体であってもよく、例えばこれらのカルボキシメチル誘導体（カルボキシメチルキトサン、カルボキシメチルブルラン、カルボキシメチルデキストラン、カルボキシメチルアノノグルカン等）、脱硫酸化誘導体（脱N硫酸化ヘパリン等）、ポリアルコール化誘導体（ポリアルコール化マンノグルカン

等）が挙げられる。カルボキシメチル誘導体の場合カルボキシメチル化度は0.5~0.7が好ましい。

【0012】また、これら以外にも、更にカルボキシル基またはアミノ基を有するように変換されたもの、および後述する医薬化合物を担持させてなるものも多糖誘導体に含まれるものとする。

【0013】医薬化合物が導入されていない多糖の分子量は、10~1,000kDが好ましく、40~150kDが特に好ましい。

10 【0014】ここで多糖およびその誘導体とは、これらのうちT²の形式に用いられた官能基（例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基等）が除かれたものを意味するものとする。

【0015】本発明による一般式(I)の化合物の好ましい化合物群としては、Eが、グルコース、マンノース、ガラクトース、フコース、ノイラミン酸、ガラクトサミン、グルコサミン、シアル酸、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミンから選択される单糖もしくはこれら单糖の誘導体、またはシュークロース、シリルルイスA、シリルルイスX、ラクトース、マルトース、ルイスXおよび硫酸化ルイスXから選択される上記单糖もしくは单糖の誘導体の2~4個からなるオリゴ糖を表し、Fが、カルボキシメチルキトサンもしくはカルボキシメチルブルランまたはこれらに医薬化合物が担持されてなるものから選択される多糖誘導体を表し、T¹が-C_mH_m-(OCH₂CH₂)_m-を表し、そしてT²が-NH-または-NHCO-を表すもの、が挙げられる。

【0016】また別の好ましい化合物群としては、EおよびFが前記と同様の内容を表し、T¹が-(CH₂)_n-を表し、T²が-CO-NH-を表すもの、が挙げられる。

【0017】また別の好ましい化合物群としては、EおよびFが前記と同様の内容を表し、T¹が前記基(II)を表し、T²が-NH-を表すもの、が挙げられる。

【0018】本発明による化合物は特定の臓器に移行する臓器移行性を有する。例えば、Eが、ガラクトース、または非還元末端にガラクトースを有するオリゴ糖（例えば、ラクトース等）であるときは、本発明による化合物は肝臓に移行する。以下の理論に拘束されるわけではないが、ガラクトースが肝臓のガラクトース/N-アセチルガラクトース認識レクチンに取り込まれたことによって臓器移行性を示すものと考えられる。なお、本明細書において「臓器移行性」とは、後述する炎症部位移行性および細胞内皮系組織を回避する性質をも包含する意味で用いられるものとする。

【0019】また、本発明による化合物は炎症部位移行性を有する。例えば、Eが、細胞接着分子ELAM-1と結合する糖であるときは、本発明による化合物は炎症を呈している部位に移行する。特に、本発明による化

5

5

物は、単に糖を投与する場合に比較して高い炎症部位移行性が認められた。

【0020】更に、本発明による化合物は細網内皮系組織を回避する性質を有する。例えば、Eが、N-アセチルノイラミン酸であるときは、本発明による化合物は細網内皮系組織である肝臓、脾臓等を回避する。

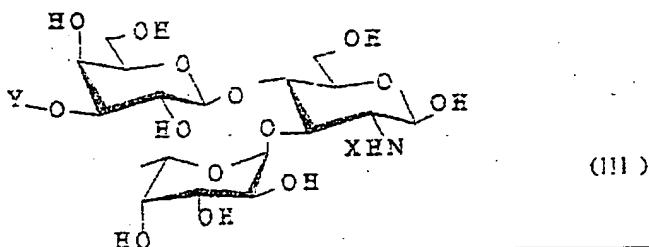
【0021】従って、本発明による化合物は特定の臓器

に抗腫瘍剤、抗炎症剤等の薬剤を送達する薬物担体として用いることができる。

【0022】ここで、上記ELAM-1と結合する化合物としては、例えば下記式(III)または(IV)で表される化合物が挙げられる。

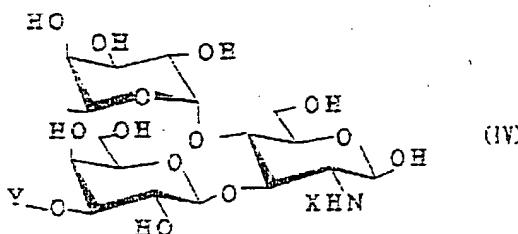
【0023】

【化3】



【0024】

【化4】



(上記式中、Xは前記と同義であり、Yはシアル酸または $-SO_2OH$ を表す)

【0025】上記式(III)において、Xが $-NHCOCH_3$ を表し、Yがシアル酸を表す化合物がシアリルルイスXであり、Xが $-NHCOOCH_3$ を表し、Yが $-SO_2OH$ を表す化合物が硫酸化ルイスXである。また、上記式(IV)においてXが $-NHCOOCH_3$ を表し、Yがシアル酸を表す化合物がシアリルルイスAである。

【0026】また、本発明による化合物は、上記のような用途を勘案して更にその構造を修飾することができ、これらの修飾された化合物、例えば多糖に医薬化合物が担持されたもの、も本発明による化合物に包含される。

【0027】医薬化合物は、直接担持されても、適當なスペーサーを介して担持されてもよい。ここで、この「スペーザー」は、生体内で医薬化合物を一定の望まれる速度で放出させる役割が果たせるものである。このようなスペーザーの具体例としては、ペプチドが挙げられる。ペプチドは、アミノ酸数2~10個のものが好ましく、より好ましくは、2~4個のものである。ペプチドを構成するアミノ酸は、中性アミノ酸、塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸のいずれであってもよく、また脂肪族アミノ酸でも芳香族アミノ酸であっても良い。また、ペプチド中に少くとも1個の異種アミノ酸が含まれている方が好ましい。

【0028】ペプチドの配列は本発明において特に限定されるものではないが、例えば以下の配列が挙げられ

る：

-Gly-Gly-Gly-DA-Tyr-
-Gly-Phe-Gly-Gly-DA-Tyr-
-Phe-Phe-Gly-DA-Tyr-
(DA-Tyrはデアミノチロシンを表す)。

【0029】本発明による化合物に担持させることができる医薬化合物としては、メトトレキサート(MTX)、ドキソルビシン(DXR)、マイトイシンC(MMC)等の抗腫瘍剤、デキサメタゾン、インドメタシン等の抗炎症剤が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0030】化合物の製造

20 <一般式(I)の化合物>

本発明による一般式(I)の化合物は、例えば、式(V)：

$E^{\bullet}-R^1$ (V)

(式中、 E^{\bullet} は前記Eの官能基を対応する保護基で保護したものであり、 R^1 は臭素原子、塩素原子、アルキルチオ基、アシルオキシ基、 $-O-C(=NH)-CCl$ を表す)の化合物と、式(VI)：

$HO-T^{\bullet}-R^2$ (VI)

(式中、 T^{\bullet} は前記と同義であり、 R^2 は、臭素原子、塩素原子、トルニンスルホニルオキシ基、メタンスルホニルオキシ基を表す)の化合物とをグリコシド結合を生じさせる反応条件化で反応させ、得られた化合物を脱保護し、次いで反応に関与しない溶媒(例えば炭酸水素ナトリウム水溶液)中、アミノ基を有する多糖と室温~70°Cの温度で12~180時間反応させることによって得ることができる。

【0031】また、本発明による一般式(I)の化合物は、前記式(V)の化合物と、式(VII)：

$HO-T^{\bullet}-R^2$ (VII)

(式中、 T^{\bullet} は前記と同義であり、 R^2 は、 $-N_2$ 、 $-NHW'$ (W' はアミノ基の保護基を表す)を表す)の化合物とをグリコシド結合を生じさせる反応条件化で反

応させ、得られた化合物を脱保護し、次いで反応に関与しない溶媒中、カルボキシル基を有する多糖と、縮合剤の存在下0～60℃の温度で2～18.0時間反応させることによって得ることができる。

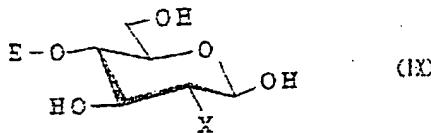
【0032】更に、本発明による一般式(I)の化合物は、上記式(V)の化合物と、式(VIII)：



(式中、T¹は前記と同義であり、R¹は、-COOW² (W²はカルボキシル基の保護基を表す)を表す)の化合物とをグリコシド結合を生じさせる反応条件化で反応させ、得られた化合物を脱保護し、次いでカルボキシル基を活性エステルに変換し、反応に関与しない溶媒(例えば、炭酸水素ナトリウム水溶液)中、アミノ基を有する多糖と0～40℃の温度で2～64時間反応させることによって得ることができる。

【0033】また、本発明による一般式(I)の化合物であって、T¹が基(II)を表す化合物は、下記式(X)の化合物：

【化5】



(式中、EおよびXは前記と同義である)とアミノ基を有する多糖とを反応に関与しない溶媒(例えば酢酸水溶液)中、水素化シアノホウ素ナトリウム(NaBH₄CN)の存在下、室温～80℃の温度で反応させることによって得ることができる。

【0034】「グリニシド結合を生じさせる反応」は、例えば次の(a)～(d)のようにして行うことができる：

(a) 糖のアノマー位の水酸基がハロゲンで置換されたハロゲン化糖と脂肪族アルコールとを、反応に関与しない溶媒(例えば、ジクロロエタン、塩化メチレン、ベンゼン、トルエン)中で、活性化剤(銀シリケート、炭酸銀、過塩素酸銀、銀トリフルオロメタンスルフォネートなどの銀塩、酸化水銀などの水銀塩、すず塩)の存在下、反応させ(プロム化糖は水酸基がアセチル化された糖を臭化水素／酢酸で処理することによって、またフッ化糖はアノマー位の水酸基が無保護の糖をジエチルアミノスルファートリフルオロライドで処理することによって得ることができる)、(b) 水酸基がアシル化された糖と脂肪酸アルコールとを、反応に関与しない溶媒(例えば塩化メチレン、ジクロロエタン)中で、酸触媒(例えば、三フッ化ホウ素・ジエチルエーテル錯体(BF₃·Et₂O)、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルフォネート(TMSOTf)、ビリジウムバラトルニンスルホン酸(PPTS)など)の存在下、反応させる、(c) 糖のアノマー位の水酸基が無保護の糖を、1,8-ジアザビシクロ(5,4,0)-7-ウンデセン

(DBU)、炭酸カリウムなどの塩基と、トリクロロアセトニトリルとで処理して、イミデートとした後、酸触媒(例えば、BF₃·Et₂O、TMSOTf、PPTSなど)の存在下で、上記(b)と同様の条件で脂肪族アルコールと反応させる、(d) 水酸基がアルキルチオ基に変換された糖と脂肪族アルニールとを、活性化剤(例えば、N-ヨードスクシンイミド(NIS)／トリフルオロメタンスルホン酸(TfOH)など)の存在下で反応させる。

【0035】カルボキシル基を有する多糖であるカルボキシメチルキトサンは、キトサンをリゾチームによって低分子化した後、水素化シアノホウ素ナトリウムによって還元し、部分脱アセチル化反応を行って得ることができる。

【0036】また、カルボキシメチルブルランは、ブルランとクロロ酢酸とを水酸化ナトリウム水溶液中、0℃～室温の温度で、1～24時間反応させることによって得ることができる。カルボキシメチルデキストラン、カルボキシメチルマンノグルカンも同様の方法で調製することができる。

【0037】アミノ基を有する多糖は、カルボキシル基を有する多糖を変換することによって得てもよい。例えば、カルボキシル基を有する多糖とH₂N-Z-NHW¹ (W¹は前記と同義であり、Zは-(CH₂)_p- (p=1～8)または-CH₂-(OCH₂CH₂)_q- (q=1～6)を表す)で表される化合物とを縮合剤の存在下、0～60℃の温度で2～18.0時間反応させることによってアミノ基を有する多糖を得ることができる。

【0038】また、多糖をポリアルコール化したポリアルニール化誘導体は、多糖を過ヨウ素酸で酸化してジオールを開裂した後、水素化シアノホウ素ナトリウム等の還元剤によって処理することにより得ることができる。

【0039】<医薬化合物の導入>本発明による多糖誘導体には、医薬化合物を担持してなるものも含まれる。薬物が導入されたアミノ基を有する多糖は、(1)カルボキシル基を有する薬物のカルボキシル基を活性エステルに変換した後、アミノ基を有する多糖と反応に関与しない溶媒(例えば炭酸水素ナトリウム水溶液)中で反応させることによって、(2)脱離基を有する薬物または脱離基を有するよう変換された薬物とアミノ基を有する多糖とを反応に関与しない溶媒(例えば炭酸水素ナトリウム水溶液)中で反応させることによって、または

(3) ホルミル基を有する薬物またはホルミル基を有するよう変換された薬物とアミノ基を有する多糖とを反応に関与しない溶媒(例えば酢酸水溶液)中、水素化シアノホウ素ナトリウムの存在下、室温～80℃で反応させることによって、得ることができる。

【0040】薬物が導入されたカルボキシル基を有する多糖は、カルボキシル基を有する多糖とアミノ基を有する薬物とを縮合剤の存在下で反応させることによって得

ることができる。

【0041】医薬化合物の導入は、一般式(I)の合成に先立って上記のように多糖に導入する以外にも、前記式(I)の化合物に直接導入することによっても行うことができる。

【0042】医薬化合物はスペーサーを介して導入することができる。スペーサーを介して医薬化合物を担持してなる多糖誘導体は、多糖にスペーサーが結合したもの、または医薬化合物にスペーサーが結合したものいずれを用いて上記のように合成してもよい。

【0043】

【実施例】本発明を以下の実施例によって更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。実施例中の化合物の番号は、後記する合成過程を示すスキーム中に示された番号である。

【0044】実施例1

(1) 化合物1-1の合成

Carbohydrate Research, 212, 277-281(1991)に記載される方法に従って合成した。

【0045】(2) 化合物1-2の合成

ヘキサエチレングリコール(23.8g)を溶解した塩化メチレン(200m1)溶液に、0°Cでトリエチルアミン(14.1m1)、メタンスルフォニルクロライド(6.52m1)を加え、同温度で1時間攪拌した。反応液を塩化メチレンで希釈し、2%クニン酸および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液により洗浄し、次いで乾燥して溶媒を減圧下留去した(23.7g)。続いて、その残渣をメチルエチルケトン(300m1)に溶解し、臭化リチウム(36.6g)を加え、1時間加熱還流下で攪拌した。反応液を室温まで冷却し、析出物を濾別した後、その濾液を飽和食塩水に加え、酢酸エチルおよび塩化エチレンにより抽出した。抽出液を乾燥後、溶媒を留去し、次いで残渣をシリカゲル(500g)を用いるカラムクロマトグラフィー(塩化エチレン-メタノール20:1)にて精製することにより、化合物1-2(1.8g)を無色油状物として得た。

【0046】¹H-NMR(CDCl₃) δ: 3.82(2H, t, J=6.3Hz)、3.75-3.70(2H, m)、3.70-3.64(8H, m)、3.63-3.60(2H, m)、3.48(2H, t, J=6.3Hz)。IR(CHCl₃): 3500cm⁻¹。

【0047】(3) 化合物1-3と化合物1-4の合成
モレキュラーシーブズ3A(1.0g)を含むアセトニトリル(12m1)溶液に化合物1-1(761m g)、化合物1-2(345mg)を加え、室温下で2時間攪拌した後、-40°CでN-ヨードスクシンイミド(509mg)およびトリフルオロメタンスルホン酸(21μl)を加え、同温度で2時間攪拌した。反応液を濾過後、濾液をチオ硫酸ナトリウム水溶液および飽和

炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄し、次いで乾燥して溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(150g、トルエン:アセトン:メタノール500:200:7)にて精製することにより、化合物1-3(368mg)と化合物1-4(357mg)を得た。

【0048】化合物1-3;無色樹脂状物

[α]_D²⁵-11.7°(c 1.15, CHCl₃)

IR(CHCl₃): 1745, 1690cm⁻¹

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 5.38(1H, dd,

d, J=8.5, 5.4, 2.7Hz)、5.32(1

H, dd, J=8.5, 2.0Hz)、5.10(1

H, d, J=8.5Hz)、4.66(1H, ddd,

J=12.7, 9.7, 4.6Hz)、4.30(1

H, dd, J=12.5, 2.7Hz)、4.09(1

H, dd, J=12.5, 5.6Hz)、4.08-

4.02(2H, m)、3.90(1H, ddd, J=

11.0, 5.4, 3.7Hz)、3.81(2H,

t, J=6.3Hz)、3.80(3H, s)、3.7

0-3.59(18H, m)、3.48(2H, t, J

=6.3Hz)、3.46(1H, m)、2.61(1

H, dd, J=12.7, 4.6Hz)、2.14,

2.14, 2.04, 2.03, 1.88(each

3H, s)、1.98(1H, dd, J=12.9, 1

2.4Hz)。

【0049】化合物1-4;無色油状物

[α]_D²⁵+3.0°(c 1.02, CHCl₃)

IR(CHCl₃): 1745, 1680cm⁻¹

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 6.30(1H, d,

2, 10.3Hz)、5.39(1H, dd, J=3.

2, 2.4Hz)、5.31(1H, ddd, J=8.

3, 3.2, 2.4Hz)、5.23(1H, m)、

4.89(1H, dd, J=12.2, 2.4Hz)、

4.61(1H, dd, J=10.7, 2.4Hz)、

4.13(1H, q like)、4.12(1H, d

d, J=12.2, 8.3Hz)、3.89(1H, d

dd, J=10.3, 5.6, 4.4Hz)、3.85

-3.62(18H, m)、3.81(2H, t, J=

6.3Hz)、3.80(3H, s)、3.52(1

H, m)、3.48(2H, t, J=6.3Hz)、

2.44(1H, dd, J=12.7, 4.4Hz)、

2.15, 2.05, 2.03, 2.00, 1.88

(each 3H, s)、1.90-1.84(1H,

m)。

【0050】(4) 化合物1-5の合成

化合物1-3(195mg)を溶解したメタノール(2.0m1)溶液に、28%ナトリウムメトキシド-メタノール溶液(200μl)を加え、室温下で30分間攪拌した。反応液を陽イオン交換樹脂(Dowex 50W H⁺)により中和した後、不溶物を濾去し、濾液を

11

減圧下濃縮した。次いで得られた残渣に1, 4-ジオキサン(2.5 ml)と0.1N水酸化ナトリウム水溶液(2.5 ml)を加え、室温下で10分間攪拌した。その後、陽イオン交換樹脂(Dowex 50wH⁻)により中和し、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮し、高分子ゲル(90cc)を用いるカラムクロマトグラフィー(メタノール)にて精製することにより化合物1-5(139mg)を無色粉末として得た。

【0051】 $[\alpha]_D^{25} -3.3^\circ$ (c 1.11, MeOH)

IR (KBr) : 3375 1616 cm⁻¹

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 3.92 (1H, m)、3.86-3.81 (2H, m)、3.80 (2H, t, J=6.3Hz)、3.78-3.55 (24H, m)、3.51 (2H, t, J=6.1Hz)、2.73 (1H, dd, J=12.4, 4.4Hz)、2.00 (3H, s)、1.74 (1H, dd, J=12.4, 11.7Hz)。

【0052】 (5) カルボキシメチルキトサンの調製
特願平2-215803号に記載されるように市販のカルボキシメチル-キチンをリゾチームによって部分的に加水分解し、NaBH₄によって非還元末端を還元し、水酸化ナトリウム水溶液によって部分的に脱アセチル化することによりカルボキシメチルキトサンを得た。

【0053】 (6) シアル酸修飾カルボキシメチルキトサン(化合物1)の合成

カルボキシメチルキトサン(100mg)と化合物1-5(382mg)とを0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(6ml)に溶解した後、炭酸水素ナトリウム(51mg)を加え、60°Cで160時間攪拌した。反応液を99.5%エタノール(35ml)に加えて粗生成物を析出させた後、その析出物を95%エタノール(40ml×3回)、アセトン(40ml)およびジエチルエーテル(40ml)の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥した(95mg)。続いて、粗生成物を10mlの水に溶解した後、透析膜(スペクトラ/ポア社製:分子量排除限界12000~14000)を用いて、精製水(1000ml)を外液として室温下で12時間透析した。透析内液を99.5%エタノール(140ml)に加えて目的物を析出させた後、その析出物を95%エタノール(40ml)、アセトン(40ml)およびジエチルエーテル(40ml)の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥することによりシアル酸修飾カルボキシメチルキトサン(化合物1、47mg、d.s.: 0.14、Neu含量: 14%)を得た(d.s.はレゾルシノール塩酸法により算出した)。

【0054】 実施例2

(1) 化合物2-1の合成

化合物1-2(1.38g)、β-D-グルコースペニタアセテート(2.34g)を溶解した塩化メチレン溶

12

液(40ml)に、0°Cで3フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体(1.48ml)を加え、同温度で12時間攪拌した。反応液を塩化メチレンで希釈し、水および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄し、次いで乾燥して溶媒を減圧下留去した。得られた残渣をシリカゲル(150g)を用いるカラムクロマトグラフィー(塩化エチレン-メタノール 50:1)にて精製することにより、化合物2-1(2.30g)を無色油状物として得た。

【0055】 $[\alpha]_D^{25} -12.5^\circ$ (c 1.21, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 1755 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 5.20 (1H, d, d, J=9.8, 9.5Hz)、5.08 (1H, d, d, J=9.8, 9.8Hz)、4.92 (1H, d, d, J=9.5, 7.8Hz)、4.61 (1H, d, J=7.8Hz)、4.26 (1H, dd, J=12.2, 4.6Hz)、4.14 (1H, dd, J=12.2, 2.4Hz)、3.94 (1H, dt, J=11.5, 4.4Hz)、3.81 (2H, t, J=6.3Hz)、3.77-3.60 (21H, m)、3.48 (2H, t, J=6.3Hz)、2.09, 2.05, 2.02, 2.01 (each 3H, s)。

【0056】 (2) 化合物2-2の合成

化合物2-1(1.08g)が溶解したメタノール(15ml)溶液に、28%ナトリウムメトキシド-メタノール溶液(200μl)を加え、室温下で30分間攪拌した。反応液を陽イオン交換樹脂(Dowex 50wH⁻)により中和した後、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮した。次いで得られた残渣をシリカゲル(150g)を用いるカラムクロマトグラフィー(塩化エチレン-メタノール 6:1)にて精製することにより、化合物2-2(755mg)を無色油状物として得た。

【0057】 $[\alpha]_D^{25} -11.6^\circ$ (c 1.26, MeOH)

IR (CHCl₃) : 3450 cm⁻¹

¹H-NMR (C₆D₅N+D₂O) δ : 4.85 (1H, d, J=7.5Hz)、4.34 (1H, dd, J=12.0, 2.5Hz)、4.25 (1H, dd, J=12.0, 5.5Hz)、4.25 (1H, dt, J=11.0, 5.0Hz)、4.22 (1H, dd, J=9.0, 9.0Hz)、4.20 (1H, dd, J=9.0, 9.0Hz)、4.01 (1H, dd, J=9.0, 7.5Hz)、3.92 (1H, ddd, J=9.0, 5.5, 2.5Hz)、3.90 (1H, dt, J=11.0, 5.0Hz)、3.77 (2H, t, J=6.0Hz)、3.72 (2H, dd, J=5.0, 5.0Hz)、3.67-3.59 (16H, m)、3.55 (2H, t, J=6.0Hz)。

【0058】 (3) グルコース修飾カルボキシメチルキト

サン(化合物2)の合成

カルボキシメチルキトサン(100mg)と化合物2(304mg)とを0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(6ml)に溶解し、60℃で64時間攪拌した。反応液を99.5%エタノール(35ml)に加えて粗目的物を析出させた後、その析出物を95%エタノール(40ml×3回)、アセトン(40ml)およびジエチルエーテル(40ml)の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥した(112mg)。

【0059】 続いて、粗生成物を10mlの水に溶解した後、透析膜(スペクトラノボア社製：分子量排除限界12000～14000)を用いて、精製水(10000ml)を外液として室温下で12時間透析した。透析内液を99.5%エタノール(140ml)に加えて目的物を析出させた後、その析出物を95%エタノール(40ml)、アセトン(40ml)およびジエチルエーテル(40ml)の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥することによりグルコース修飾カルボキシメチルキトサン(化合物2、90mg、ds:0.20、Man含量:11%)を得た(dsはフェノール硫酸法により算出した)。

【0060】 実施例3

(1) 化合物3-1の合成

化合物1-2(2.07g)、 α -D-マンノースペクターアセテート(3.51g)を溶解した塩化メチレン溶液(60ml)に、0℃で3フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体(2.94ml)を加え、室温下で48時間攪拌した。反応液を塩化メチレンで希釈し、水洗し、乾燥して溶媒を減圧下留去した。続いて得られた残渣をシリカゲル(330g)を用いるカラムクロマトグラフィー(塩化エチレン-メタノール100:1)にて精製することにより、化合物3-1(2.54g)を無色油状物として得た。

【0061】 $[\alpha]_D^{25} + 26.9^\circ$ (c 1.09, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 1747 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 5.36 (1H, d, J = 10.0, 3.4Hz)、5.29 (1H, d, J = 10.0, 10.0Hz)、5.27 (1H, dd, J = 3.4, 1.7Hz)、4.61 (1H, d, J = 1.7Hz)、4.30 (1H, dd, J = 12.0, 4.6Hz)、4.14 (1H, dd, J = 12.0, 2.2Hz)、3.81 (2H, t, J = 6.3Hz)、3.71-3.64 (20H, m)、3.48 (2H, t, J = 6.3Hz)、2.16, 2.11, 2.04, 1.99 (each 3H, s)。

【0062】 (2) 化合物3-2の合成

化合物3-1(2.07g)が溶解したメタノール(20ml)溶液に、28%ナトリウムメトキシド-メタノール溶液(150μl)を加え、室温下で20分間攪拌

した。反応液を陽イオン交換樹脂(Dowex 50Wx1)により中和した後、不溶物を滤去し、滤液を減圧下濃縮した。続いて得られた残渣をシリカゲル(150g)を用いるカラムクロマトグラフィー(塩化エチレン-メタノール6:1)にて精製することにより化合物3-2(755mg)を無色油状物として得た。

【0063】 $[\alpha]_D^{25} + 30.8^\circ$ (c 1.00, MeOH)

IR (CHCl₃) : 3450 cm⁻¹

¹H-NMR (C₆D₆, N+D₂O) δ : 5.38 (1H, br. s)、4.63 (1H, dd, J = 9.3, 9.3Hz)、4.56-4.52 (2H, m)、4.52 (1H, dd, J = 11.5, 2.2Hz)、4.37 (1H, dd, J = 11.5, 5.9Hz)、4.32 (1H, dd, J = 9.3, 5.9, 2.2Hz)、4.07 (1H, dd, J = 10.7, 5.1, 3.7Hz)、3.80 (2H, t, J = 6.1Hz)、3.76 (1H, dd, J = 10.7, 5.9, 4.2Hz)、3.72-3.60 (18H, m)、3.58 (2H, t, J = 6.1Hz)。

【0064】 (3) マンノース修飾カルボキシメチルキトサン(化合物3)の合成

実施例2(3)に記載される方法と同様の方法によってマンノース修飾カルボキシメチルキトサン(化合物3、ds:0.20、Man含量:11%)を得た(dsはフェノール硫酸法により算出した)。

【0065】 実施例4

(1) 化合物4-1の合成

化合物1-2(345mg)、 α -D-ガラクトースペクターアセテート(586mg)を溶解した塩化メチレン溶液(10ml)に、0℃で3フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体(369μl)を加え、室温下で14時間攪拌した。反応液を塩化メチレンで希釈し、水洗し、乾燥して溶媒を減圧下留去した。続いて得られた残渣をシリカゲル(200g)を用いるカラムクロマトグラフィー(塩化メチレン-メタノール20:1)にて精製することにより、化合物4-1(473mg)を無色油状物として得た。

【0066】 $[\alpha]_D^{25} - 4.8^\circ$ (c 1.03, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 1749, 1712 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 5.39 (1H, d, J = 3.4Hz)、5.21 (1H, dd, J = 10.5, 8.1Hz)、5.02 (1H, dd, J = 10.5, 3.4Hz)、4.57 (1H, d, J = 8.1Hz)、4.17 (1H, dd, J = 11.2, 6.6Hz)、4.13 (1H, dd, J = 12.2, 6.8Hz)、3.96 (1H, dd, J = 11.0, 9.8, 4.2Hz)、3.91 (1H, dd, J = 6.8, 6.6Hz)、3.81 (2H, t, J = 6.3Hz)

15

z)、3. 7.5 (1H, d d d, J = 11. 0, 7. 1, 4. 2 Hz)、3. 7.0 - 3. 6.2 (18H, m)、3. 4.8 (2H, t, J = 6. 3 Hz)、2. 1.5, 2. 0.6, 2. 0.5, 1. 9.9 (each 3H, s)。

【0067】(2) 化合物4-2の合成

化合物4-1 (1. 73 g) が溶解したメタノール (20 ml) 溶液に、28%ナトリウムメトキシド-メタノール溶液 (150 μl) を加え、室温下で20分間攪拌した。反応液を陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W H⁺) により中和した後、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮した。続いて得られた残渣をシリカゲル (70 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化エチレン-メタノール6:1) にて精製することにより化合物4-2 (1. 16 g) を無色油状物として得た。

【0068】[α]_D²⁵ -3. 8° (c 1. 01, M eOH)

IR (CHCl₃) : 3450 cm⁻¹
¹H-NMR (C₆D₆N+D₂O) δ : 4. 7.6 (1H, d, J = 7. 8 Hz)、4. 4.9 (1H, d, J = 3. 2 Hz)、4. 3.9 (1H, d d, J = 9. 5, 7. 8 Hz)、4. 3.8 (1H, d d, J = 11. 2, 6. 6 Hz)、4. 3.5 (1H, d d, J = 11. 5, 6. 1 Hz)、4. 2.5 (1H, m)、4. 1.3 (1H, d d, J = 9. 5, 3. 2 Hz)、4. 0.2 (1H, d d, J = 6. 6, 6. 1 Hz)、3. 9.3 (1H, d d d, J = 10. 7, 6. 1, 4. 4 Hz)、3. 8.2 (2H, t, J = 5. 9 Hz)、3. 7.4 (1H, m)、3. 7.1 - 3. 6.2 (17H, m)、3. 5.9 (2H, t, J = 5. 9 Hz)。

【0069】(3) ガラクトース修飾カルボキシメチルキトサン (化合物4) の合成

実施例2 (3) に記載される方法と同様の方法によってガラクトース修飾カルボキシメチルキトサン (化合物4、d_s : 0. 23, Ga含量 : 13%) を得た (d_sはフニノール硫酸法により算出した)。

【0070】実施例5

(1) 化合物5-2の合成

2, 3, 4-トリ-O-ベンジル-1-O-バラニトコベンジル-フコピラノース (化合物5-1, α : β = 6:6.4, 8.75 mg)、トリフルオロメタンスルホン酸亜鉛 (5.45 mg) および化合物1-2 (3.45 mg) をアセトニトリル (20 ml) に溶解し、0°Cでクロロトリメチルシラン (1.90 μl) を加えた。同温度で2時間攪拌後、反応液を塩化メチレンで希釈し、水および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄し、次いで乾燥して溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲル (7.0 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (トルエン-アセトン 7:1) にて精製することにより、化合物5-2 (4.44 mg) をαグリコシド:βグリコシド = 7

16

1:2.9の混合物 (¹H-NMRの積分比より) として得た。

【0071】¹H-NMR (CDCl₃) δ : αグリコシド由来 - 7. 4.1 - 7. 2.6 (15H, m)、4. 9.8, 4. 7.4 (each 1H, d, J = 11. 5 Hz)、4. 8.7, 4. 6.9 (each 1H, d, J = 12. 2 Hz)、4. 7.9, 4. 6.5 (each 1H, d, J = 12. 0 Hz)、4. 8.6 (1H, d, J = 3. 7 Hz)、4. 0.2 (1H, d d, J = 10. 3, 3. 7 Hz)、3. 9.4 (1H, d d, J = 10. 3, 2. 9 Hz)、3. 9.3 (1H, q, J = 6. 6 Hz)、3. 8.0 (2H, t, J = 6. 3 Hz)、3. 7.5 - 3. 5.7 (21H, m)、3. 4.6 (2H, t, J = 6. 3 Hz)、1. 1.0 (3H, d, J = 6. 6 Hz)
z)。βグリコシド由来 - 4. 7.5 (1H, d, J = 7. 5 Hz)、1. 1.7 (3H, d, J = 6. 3 Hz) z)。

【0072】(2) 化合物5の合成

化合物5-2 (3. 00 g) が溶解したテトラヒドロフラン (120 ml) 溶液に、パラジウム-炭素 (10%, 1.50 g) を加え、中圧水素気流下 (50 ps) により中和した後、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮した。続いて得られた残渣をシリカゲル (600 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化エチレン-メタノール 15:1) にて精製することにより、化合物5 (1. 10 g) を無色油状物として得た。

【0073】[α]_D²⁵ -65. 6° (c 1. 35, M eOH)

IR (CHCl₃) : 3570, 3500 cm⁻¹
¹H-NMR (CD₃OD) δ : 4. 7.8 (1H, d, J = 3. 7 Hz)、4. 0.1 (1H, q, J = 6. 6 Hz)、3. 8.0 (2H, t, J = 6. 1 Hz)、3. 8.0 (1H, m)、3. 7.4 (1H, d d, J = 10. 0, 3. 2 Hz)、3. 7.0 (1H, d d, J = 10. 0, 3. 7 Hz)、3. 7.0 - 3. 5.9 (20H, m)、3. 5.1 (2H, t, J = 6. 1 Hz)、3. 2.6 (1H, m)、1. 2.0 (3H, d, J = 6. 6 Hz) z)。

【0074】(3) フコース修飾カルボキシメチルキトサン (化合物5) の合成

実施例2 (3) に記載される方法と同様の方法によってフコース修飾カルボキシメチルキトサン (化合物5, d_s : 0. 20, Fuc含量 : 10. 5%) を得た (d_sはフニノール硫酸法により算出した)。

【0075】実施例6

(1) 化合物6-1の合成

β-D-ガラクトサミンペントアセテート (2. 20 g) を、1, 2-塩化エチレン (30 ml) に溶解した後、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルフォネート (1. 19 ml) を加え、50°Cで1時間攪拌した。

17

室温下でトリエチルアミン (1. 70 ml) を加えた後、溶媒を留去し、その残渣をシリカゲル (45 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化エチレン・メタノール・トリエチルアミン 40:1:4) にて精製することにより、化合物 6-1 (1. 90 g) を粗生成物として得た。

【0076】(2) 化合物 6-2 の合成

化合物 1-2 (1. 62 g) および化合物 6-1 (1. 90 g) を、モレキュラーシーブズ 4A (1. 2 g) を含む 1, 2-塩化エチレン溶液 (12 ml) に溶解した後、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルフォネート ($870 \mu l$) を加え、50°Cで1時間攪拌した。室温下でトリエチルアミン (1. 40 ml) を加え、反応液を濾過した後、濾液を塩化メチレンで希釈し、水洗し、乾燥した後溶媒を留去した。続いて、残渣をシリカゲル (150 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (トルエン・アセトン・メタノール 500:300:8) にて精製することにより、化合物 6-2 (2. 95 g) を無色油状物として得た。

【0077】 $[\alpha]_D^{25} = -19.9^\circ$ (c 0.98, C 20 HCl.)

IR (CHCl₃) : 1745, 1678 cm⁻¹
¹H-NMR (CDCl₃) δ : 6.53 (1H, d, J = 9.0 Hz), 5.32 (1H, br. d), 4.99 (1H, dd, J = 11.2, 3.4 Hz), 4.79 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.25 (1H, dd, J = 11.2, 9.0, 8.5 Hz), 4.18 (1H, dd, J = 11.2, 6.6 Hz), 4.18 (1H, dd, J = 11.2, 6.8 Hz), 3.90 (1H, dd, J = 6.8, 6.6 Hz), 3.87 (1H, m), 3.81 (2H, t, J = 6.3 Hz), 3.75-3.59 (2H, m), 3.47 (2H, t, J = 6.3 Hz), 2.16, 2.05, 1.99, 1.98 (each 3H, s)。

【0078】(3) 化合物 6 の合成

化合物 6-2 (2.20 g) が溶解したメタノール (28 ml) 溶液に、28%ナトリウムメトキシド・メタノール溶液 (200 μl) を加え、室温下で20分間攪拌した。反応液を陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W H⁺) により中和した後、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮した。続いて得られた残渣をシリカゲル (70 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン・メタノール 6:1) にて精製することにより化合物 6 (1.58 g) を無色油状物として得た。

【0079】 $[\alpha]_D^{25} = -3.7^\circ$ (c 1.04, MeOH)

IR (KBr) : 3370, 1661 cm⁻¹

¹H-NMR (C₂D₅N + D₂O) δ : 5.04 (1H, d, J = 8.3 Hz), 4.88 (1H, dd, J = 10.5, 8.3 Hz), 4.46 (1H, br.

18

d), 4.38 (1H, dd, J = 11.2, 6.6 Hz), 4.34 (1H, dd, J = 11.2, 5.8 Hz), 4.30 (1H, dd, J = 10.5, 3.2 Hz), 4.16 (1H, dt, J = 11.2, 4.4 Hz), 3.90 (1H, dd, J = 6.6, 5.8 Hz), 3.93 (1H, dt, J = 11.2, 5.3 Hz), 3.81 (2H, t, J = 6.1 Hz), 3.72-3.62 (18H, m), 3.59 (2H, t, J = 6.1 Hz), 2.16 (3H, s)。

【0080】(4) Nアセチルガラクトサミン修飾カルボキシメチルキトサン (化合物 6) の合成
 実施例 2 (3) に記載される方法と同様の方法によって Nアセチルガラクトサミン修飾カルボキシメチルキトサン (化合物 6) を得た。

【0081】実施例 7

(1) 化合物 7-1 の合成

β -D-グルニサミンペントアセテート (14.0 g) を、1, 2-塩化エチレン (180 ml) に溶解した後、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルフォネート (6.96 ml) を加え、55°Cで4時間攪拌した。室温下でトリエチルアミン (10.1 ml) を加えた後、溶媒を留去し、その残渣をシリカゲル (200 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化エチレン・メタノール・トリエチルアミン 200:1:1) にて精製することにより、化合物 7-1 を粗生成物 (11.8 g) として得た。

【0082】(2) 化合物 7-2 の合成

化合物 7-1 (1.85 g) および化合物 1-2 (1.56 g) を、モレキュラーシーブズ 4A (1.2 g) を含む 1, 2-塩化ニチレン溶液 (12 ml) に溶解した後、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルフォネート ($835 \mu l$) を加え、50°Cで1時間攪拌した。室温下でトリエチルアミン (1.40 ml) を加え、反応液を濾過した後、濾液を塩化メチレンで希釈し、水洗し、乾燥した後溶媒を留去した。続いて、残渣をシリカゲル (150 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (トルエン・アセトン・メタノール 500:300:8) にて精製することにより、化合物 7-2 (2.45 g) を無色油状物として得た。

【0083】 $[\alpha]_D^{25} = -14.7^\circ$ (c 1.18, C HCl.)

IR (CHCl₃) : 3622, 1747, 1678 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 6.61 (1H, d, J = 9.3 Hz), 5.11-5.10 (2H, m), 4.79 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.26 (1H, dd, J = 12.2, 4.6 Hz), 4.17 (1H, dd, J = 12.2, 2.4 Hz), 4.10 (1H, m), 3.90 (1H, m), 3.86-3.76 (2H, m), 3.81 (2H, t, J = 6.3 Hz)

19

z)、3.75-3.58 (18H, m)、3.48 (2H, t, J=6.3Hz)、2.09, 1.97 (each 3H, s)、2.01 (6H, s)。

【0084】(3) 化合物7-3の合成

化合物7-2 (13.0g) が溶解したメタノール溶液 (40m!) に、28% テトリウムメトキシド・メタノール溶液 (0.3m!) を加え、室温下で80分間攪拌した。反応液を、陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W x 8 (H⁺)) により中和した後、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮した (10.2g) 続いて、得られた残渣 (10.2g) をN, N'-ジメチルホルムアミド (50m!) に溶解し、ベンズアルデヒドジメチルアセタール (10.9m!) とd-カンファースルホン酸 (125mg) を加え55°Cで3時間減圧下 (45mmHg) 攪拌した。反応液を陰イオン交換樹脂 (AG-1 (OH⁻)) により中和した後、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮し、続いて残渣をシリカゲル (15g) を用いるカラムクロマトグラフィー (トルエン-アセトン-メタノール 200:300:10) にて精製することにより化合物7-3 (7.57g) を無色非晶質として得た。

【0085】[α]_D²⁵-55.4° (c 1.04, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 3352, 1666 cm⁻¹
¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.52-7.47 (2H, m)、7.33-7.32 (3H, m)、7.15 (1H, b r. d, J=6.3Hz)、5.57 (1H, s)、4.75 (1H, d, J=8.1Hz)、4.33 (1H, dd, J=10.5, 4.9Hz)、3.94-3.77 (5H, m)、3.75 (2H, t, J=6.2Hz)、3.72-3.57 (17H, m)、3.45 (1H, m, H-5)、3.44 (2H, t, J=6.2Hz)、2.07 (3H, s)。

【0086】(4) 化合物7-4の合成

J. Carbohydrate Chemistry, 10(4), 549-560 (1991) の記載に従って合成した。

【0087】(5) 化合物7-5の合成

モレキュラーシーブズ4A (10g) を含む塩化メチレン (20m!) に化合物7-3 (636mg) と化合物7-4 (697mg) を加え、室温下で2時間攪拌した後、0°Cでジメチル(メチルチオ)スルフォニウムトリフレート (1.16g) を加え、同温度で30分間攪拌した。反応液にメタノール (2m!) とトリエチルアミン (1m!) を加えた後、その混合物を濾過し、濾液を塩化メチレンで希釈し、有機層を水洗し、乾燥して溶媒を留去した。続いて得られた残渣をシリカゲル (70g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン-メタノール 50:1) にて精製することにより、化合物7-5 (896mg) を無色油状物として得た。な

20

お、¹H-NMRによる考察より、得られた化合物にはフコースがβグリコシド結合していると推定される化合物が約6%混入していたが、これ以上精製することなく次の工程へ進んだ。

【0088】IR (CHCl₃) : 1677 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.45-7.42 (2H, m)、7.39-7.24 (18H, m)、6.05 (1H, d, J=8.1Hz)、5.50 (1H, s)、5.17 (1H, d, J=3.7Hz)、4.92 (1H, d, J=8.3Hz)、4.91, 4.79, 4.71, 4.57 (each 1H, d, J=11.7Hz)、4.78, 4.70 (each 1H, d, J=11.5Hz)、4.33 (1H, d, d, J=10.5, 4.9Hz)、4.22 (1H, d, J=9.5, 9.5Hz)、4.11 (1H, q, J=6.3Hz)、4.04 (1H, dd, J=10.3, 3.7Hz)、3.94 (1H, dd, J=10.3, 2.7Hz)、3.78 (2H, t, J=6.3Hz)、3.80-3.72 (2H, m)、3.70-3.58 (20H, m)、3.56 (1H, m)、3.52-3.45 (2H, m)、3.45 (2H, t, J=6.3Hz)、1.75 (3H, s)、0.82 (3H, d, J=6.3Hz)。

【0089】(6) 化合物7-6の合成

モレキュラーシーブズ3A (20g) を含むテトラヒドロフラン溶液 (60m!) に化合物7-5 (5.20g) を溶解し、室温下で2時間攪拌した後、水素化シアノホウ素ナトリウム (4.66g) を、ゆっくり加えた。水素化シアノホウ素ナトリウムが完全に溶け終わったのち、塩化水素-ニーテル溶液をガスの発生がおさまるまで滴加し、15分間攪拌した。反応液を濾過し、濾液を塩化メチレンで希釈した後、2N塩酸および2N水酸化ナトリウム水溶液により洗浄し、次いで乾燥した後溶媒を留去した。残渣を高分子ゲル (900cc) を用いるカラムクロマトグラフィー (メタノール) およびシリカゲル (600g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン-メタノール 50:1) にて精製することにより、化合物7-6 (4.02g) を無色非晶質として得た。

【0090】[α]_D²⁵-50.8° (c 0.51, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 3631, 3450, 1674 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃+D₂O) δ: 7.41-7.25 (20H, m)、6.14 (1H, d, J=7.8Hz)、4.97 (1H, d, J=3.7Hz)、4.95, 4.61 (each 1H, d, J=11.2Hz)、4.84 (1H, d, J=8.3Hz)、4.81, 4.79, 4.75, 4.67 (each 1H, d, J=11.7Hz)、4.62, 4.

21

5.8 (each 1H, d, J=12.2 Hz)、4.13 (1H, q, J=6.3 Hz)、4.06 (1H, dd, J=10.3, 3.7 Hz)、3.97 (1H, m)、3.95 (1H, m)、3.84-3.57 (2.3 H, m)、3.78 (2H, t, J=6.3 Hz)、3.52-3.41 (3H, m)、3.45 (2H, t, J=6.3 Hz)、1.66 (3H, s)、1.14 (3H, J=6.3 Hz)。

【0091】(7) 化合物7-7の合成

J. Carbohydrate Chemistry, 8(2) 265-283 (1989) に記載されるに従って合成した。

【0092】(8) 化合物7-8の合成

モレキュラーシーブズ4A (2 g) を含む塩化メチレン溶液 (6 ml) に化合物7-7 (400 mg) よび化合物7-6 (1.07 g) を溶解し、室温下で2時間攪拌した後、0°Cで3フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (100 μl) を加え、同温度で2時間攪拌した。反応液を濾過した後、濾液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、乾燥後溶媒を減圧下留去した。得られた残渣を、シリカゲル (120 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン・メタノール 8:1) にて精製することにより、化合物7-8 (460 mg) を無色粉末として得た。

【0093】 $[\alpha]_D^{25} -34.0^\circ$ (c 0.63, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 1744, 1688 cm⁻¹
¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.97 (2H, m)、7.50 (1H, m)、7.37 (2H, m)、7.36-7.22 (20H, m)、6.23 (1H, m)、5.69 (1H, dd, J=9.3, 5.6, 2.7 Hz)、5.37 (1H, dd, J=9.3, 2.7 Hz)、5.21 (1H, d, J=3.7 Hz)、5.06 (1H, br. d)、5.04 (1H, br. d)、4.97 (1H, dd, J=10.0, 8.1 Hz)、4.94, 4.63 (each 1H, d, J=11.7 Hz)、4.90 (1H, dd, J=12.0, 10.3, 4.7 Hz)、4.81 (1H, d, J=7.8 Hz)、4.81, 4.70 (each 1H, d, J=12.9 Hz)、4.77, 4.75, 4.57, 4.44 (each 1H, d, J=12.2 Hz)、4.74 (1H, d, J=7.3 Hz)、4.67 (1H, dd, J=10.0, 3.7 Hz)、4.30 (1H, dd, J=12.4, 2.7 Hz)、4.24 (1H, dd, J=11.0, 7.1 Hz)、4.20 (1H, m)、4.17 (1H, dd, J=11.0, 7.3 Hz)、4.10-4.05 (2H, m)、4.04 (1H, m)、4.01 (1H, m)、3.98 (1H, dd, J=12.4, 5.6 Hz)、3.94 (1H, dd, J=7.3, 7.1 Hz)、3.91 (1H, dd, J=10.0, 4.7 Hz)

10

22

z)、3.87 (1H, dd, J=10.3, 2.4 Hz)、3.87-3.73 (5H, m)、3.79 (2H, t, J=6.3 Hz)、3.75 (3H, s)、3.67-3.48 (21H, m)、3.46 (2H, t, J=6.3 Hz)、2.56 (1H, dd, J=12.4, 4.6 Hz)、2.22, 2.09, 2.07, 2.01, 1.97, 1.96, 1.89, 1.85 (each 3H, s)、1.71 (1H, dd, J=12.4, 12.0 Hz)、1.10 (3H, d, J=6.3 Hz)。

【0094】(9) 化合物7-9の合成

化合物7-8 (200 mg) を溶解したテトラヒドロフラン (15 ml) 溶液にパラジウム・炭素 (10%, 80 mg) を加え、水素気流下、室温下で24時間攪拌した。反応液より粗雑を離別した後、濾液を濃縮し、残渣を分取用薄層クロマトグラフィー (塩化メチレン・メタノール 8:1) にて精製することにより化合物7-9 (118 mg) と化合物7-10 (25 mg) を得た。

【0095】化合物7-9; 無色粉末

20 $[\alpha]_D^{25} -53.1^\circ$ (c 0.66, CHCl₃)
 IR (KBr) : 3450, 1749, 1665 cm⁻¹
¹H-NMR (CDCl₃ + D₂O) δ: 8.04 (2H, m)、7.59 (1H, m)、7.48 (2H, m)、5.61 (1H, m)、5.33 (1H, dd, J=9.3, 2.7 Hz)、5.06 (1H, d, J=2.7 Hz)、5.05 (1H, d, J=3.9 Hz)、4.98 (1H, dd, J=10.3, 8.1 Hz)、4.89 (1H, ddd, J=12.0, 10.3, 4.6 Hz)、4.75 (1H, d, J=8.1 Hz)、4.66 (1H, d, J=5.1 Hz)、4.63 (1H, dd, J=10.3, 3.4 Hz)、4.43 (1H, dd, J=12.4, 2.9 Hz)、4.42-4.38 (2H, m)、4.23 (1H, dd, J=11.0, 6.8 Hz)、4.15-3.90 (7H, m)、3.85 (1H, m)、3.81 (2H, t, J=6.3 Hz)、3.77 (3H, s)、3.73-3.60 (25H, m)、3.48 (2H, t, J=6.3 Hz)、2.59 (1H, dd, J=12.7, 4.6 Hz)、2.24, 2.11, 2.06, 2.04, 2.01, 1.85 (each 3H, s)、2.14 (6H, s)、1.71 (1H, dd, J=12.7, 12.0 Hz)、1.27 (3H, d, J=6.6 Hz)。

【0096】化合物7-10; 無色粉末

20 $[\alpha]_D^{25} -56.5^\circ$ (c 0.34, CHCl₃)
 IR (KBr) : 3452, 1749, 1663 cm⁻¹
¹H-NMR (CDCl₃ + D₂O) δ: 8.04 (2H, m)、7.59 (1H, m)、7.48 (2H, m)、5.61 (1H, m)、5.33 (1H, dd, J=9.1, 2.7 Hz)、5.07-5.04 (2H, m)

H, m)、4. 98 (1H, d d, J = 10. 3, 8. 3 Hz)、4. 89 (1H, m)、4. 74 (1H, d, J = 8. 3 Hz)、4. 66 (1H, d, J = 4. 9 Hz)、4. 63 (1H, d d, J = 10. 3, 3. 4 Hz)、4. 42 (1H, d d, J = 12. 5, 2. 9 Hz)、4. 39 (1H, m)、4. 39 (1H, d d, J = 11. 0, 6. 8 Hz)、4. 23 (1H, d d, J = 11. 2, 6. 8 Hz)、4. 16-3. 89 (7H, m)、3. 87-3. 76 (3H, m)、3. 78 (3H, s)、3. 75-3. 57 (23H, m)、3. 53 (2H, q, J = 7. 1 Hz)、2. 59 (1H, d d, J = 12. 7, 4. 4 Hz)、2. 24, 2. 14, 2. 14, 2. 11, 2. 06, 2. 05, 2. 01, 1. 86 (each 3H, s)、1. 72 (1H, d d, J = 12. 7, 12. 0 Hz)、1. 26 (3H, d, J = 6. 6 Hz)、1. 21 (3H, t, J = 7. 1 Hz)。

【0097】(10)化合物7-11の合成

化合物7-10 (14 mg) を溶解したメタノール (2 ml) 溶液に、3%ナトリウムメトキシド-メタノール溶液 (400 μl) を加え、室温下で30分間攪拌した。反応液を陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-H⁺) により中和した後、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮した。次いで得られた残渣に0. 1N水酸化ナトリウム水溶液 (2 ml) を加え、室温下で10分間攪拌した。その後陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-H⁺) によって中和し、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮し、高分子ゲル (200 cc) を用いるカラムクロマトグラフィー (メタノール) にて精製することにより化合物7-11 (9 mg) を無色粉末として得た。

【0098】[α]_D²⁵-39. 6° (c 0. 33, MeOH)

IR (KBr) : 3400, 1650 cm⁻¹
¹H-NMR (CD₃OD) δ : 5. 03 (1H, d, J = 3. 9 Hz)、4. 86-4. 79 (1H, m)、4. 52-4. 49 (2H, m)、4. 03 (1H, d d, J = 9. 8, 2. 9 Hz)、4. 00 (1H, d d, J = 12. 2, 3. 4 Hz)、3. 95-3. 49 (38H, m)、3. 53 (2H, q, J = 7. 1 Hz)、3. 45-3. 40 (2H, m)、2. 81 (1H, d d, J = 12. 2, 4. 2 Hz)、2. 01, 1. 97 (each 3H, s)、1. 83 (1H, d d, J = 12. 2, 12. 2 Hz)、1. 19 (3H, t, J = 7. 1 Hz)、1. 16 (3H, d, J = 6. 6 Hz)。

【0099】(11)化合物7-12の合成

化合物7-9 (220 mg) が溶解したメタノール (5. 0 ml) 溶液に、28%ナトリウムメトキシド-メタノール溶液 (200 μl) を加え、室温下で30分間攪拌した。反応液を陽イオン交換樹脂 (Dowex 5

0W-H⁺) により中和した後、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮した。次いで得られた残渣に0. 1N水酸化ナトリウム水溶液 (3. 0 ml) を加え、室温下で10分間攪拌した。その後陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-H⁺) によって中和し、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮し、高分子ゲル (200 cc) を用いるカラムクロマトグラフィー (メタノール) にて精製することにより化合物7-12 (150 mg) を無色粉末として得た。

【0100】[α]_D²⁵-39. 4° (c 0. 66, MeOH)
 IR (KBr) : 3460, 1653 cm⁻¹
¹H-NMR (CD₃OD) δ : 5. 03 (1H, d, J = 3. 9 Hz)、4. 85-4. 83 (1H, m)、4. 52 (1H, d, J = 7. 8 Hz)、4. 50 (1H, d, J = 7. 6 Hz)、4. 03 (1H, d d, J = 9. 5, 2. 9 Hz)、4. 00 (1H, d d, J = 12. 2, 3. 7 Hz)、3. 95-3. 83 (8H, m)、3. 81 (2H, t, J = 6. 1 Hz)、3. 79-3. 60 (28H, m)、3. 56 (1H, d d, J = 9. 5, 7. 8 Hz)、3. 51 (2H, t, J = 6. 1 Hz)、3. 50 (1H, d d, J = 9. 0, 1. 2 Hz)、3. 45-3. 41 (2H, m)、2. 80 (1H, d d, J = 12. 4, 4. 4 Hz)、2. 00, 1. 97 (each 3H, s)、1. 85 (1H, d d, J = 13. 3, 11. 5 Hz)、1. 16 (3H, d, J = 6. 6 Hz)。

【0101】(12)シリアルルイスX修飾カルボキシメチルキトサン (化合物?) の合成

カルボキシメチルキトサン (40 mg) と化合物1 (276 mg, 0. 24 mmole) とを0. 5%炭酸水素ナトリウム水溶液 (3 ml) に溶解した後、炭酸水素ナトリウム (20 mg) を加え、60°Cで160時間攪拌した。反応液を99. 5%エタノール (35 ml) に加えて粗目的物を析出させた後、その析出物を95%エタノール (40 ml × 3回)、アセトン (40 ml) よびジエチルエーテル (40 ml) の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥した (58 mg)。

【0102】続いて、粗生成物を10 mlの水に溶解した後、透析膜 (スペクトラ/ボア社製: 分子量排除限界 12000~14000) を用いて、精製水 (1000 ml) を外液として室温下で12時間透析した。透析内液を99. 5%エタノール (140 ml) に加えて目的物を析出させた後、その析出物を95%エタノール (40 ml)、アセトン (40 ml) よびジエチルエーテル (40 ml) の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥することによりシリアルルイスX修飾カルボキシメチルキトサン (化合物7, 47 mg, d_s : 0. 17, SLE X含量: 33%) を得た (d_s はシリアル酸の定量法であるレゾルシノール塩酸法にて求めた)。

【0103】実施例8

(1) 化合物8-1の合成

化合物7-3 (240 mg) を溶解したN, N'-ジメチルホルムアミド溶液 (3 ml) に、酸化バリウム (1.27 mg) 、水酸化バリウム8水和物 (24 mg) およびベンジルプロミド (90 μl) を加え、室温下で12時間攪拌した。反応液にメタノール (3 ml) と28%ナトリウムメトキシド-メタノール溶液 (150 μl) を加え、室温下で20分間攪拌した後、塩化エチレンで希釈し、飽和食塩水にて洗浄し、次いで乾燥後溶媒を留去した。続いて、得られた残渣をシリカゲル (30 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化エチレン-メタノール 50:1) にて精製することにより、化合物8-1 (233 mg) を無色非晶質として得た。

【0104】 $[\alpha]_D^{25} = -13.4^\circ$ (c 1.03, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 3460, 3340, 1674 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.51-7.47 (2H, m)、7.42-7.22 (8H, m)、6.36 (1H, d, J=8.1 Hz)、5.57 (1H, s)、4.95 (1H, d, J=8.1 Hz)、4.90, 4.66 (each 1H, d, J=12.0 Hz)、4.35 (1H, c, d, J=10.5, 5.1 Hz)、4.05 (1H, d, d, J=9.8, 9.5 Hz)、3.90 (1H, m)、3.80 (1H, m)、3.77 (2H, t, J=6.3 Hz)、3.44 (2H, t, J=6.3 Hz)、3.73-3.46 (2H, m)、1.95 (3H, s)。

【0105】(2) 化合物8-2の合成

モレキュラーシーブズ3A (3 g) を含むテトラヒドロフラン溶液 (8 ml) に化合物8-1 (500 mg) を溶解し、室温下で2時間攪拌した後、水素化シアノホウ素ナトリウム (650 mg) を、ゆっくり加えた。水素化シアノホウ素ナトリウムが完全に溶け終わったのち、塩化水素-エーテル溶液をガスの発生がおさまるまで滴加し、10分間攪拌した。反応液を濾過し、濾液を塩化メチレンで希釈した後、2N塩酸および2N水酸化ナトリウム水溶液により洗浄し、次いで乾燥後溶媒を留去した。残渣を高分子ゲル (300 cc) を用いるカラムクロマトグラフィー (メタノール) およびシリカゲル (150 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン-メタノール 50:1) により精製し、化合物8-2 (395 mg) を無色非晶質として得た。

【0106】 $[\alpha]_D^{25} = -14.8^\circ$ (c 1.11, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 3460, 3350, 1674 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.38-7.24 (10H, m)、6.36 (1H, d, J=7.3 Hz)

z, NH)、4.81 (1H, d, J=8.3 Hz)、4.77, 4.71 (each 1H, d, J=11.5 Hz)、4.61, 4.56 (each 1H, d, J=12.0 Hz)、3.90 (1H, m)、3.80-3.72 (5H, m)、3.77 (2H, t, J=6.3 Hz)、3.71-3.57 (19H, m)、3.51 (1H, m)、3.45 (2H, t, J=6.3 Hz)、2.76 (1H, br. s, OH)、1.96 (3H, s)。

10 【0107】(3) 化合物8-3の合成

モレキュラーシーブズ4A (1.5 g) を含む塩化メチレン溶液 (5 ml) に化合物7-7 (200 mg) 、化合物8-2 (370 mg) を溶解し、室温下で2時間攪拌した後、0°Cで3フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (50 μl) を加え、同温度で3時間攪拌した。反応液を濾過した後、濾液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、乾燥後溶媒を減圧下留去した。得られた残渣を、シリカゲル (20 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化エチレン-メタノール 30:1) にて精製することにより、化合物8-3 (272 mg) を無色粉末として得た。

【0108】 $[\alpha]_D^{25} = -21.8^\circ$ (c 0.38, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 3300, 1751, 1662 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.96 (2H, m)、7.53 (1H, m)、7.38 (2H, m)、7.34-7.18 (10H, m)、6.30 (1H, br. d, J=8.0 Hz)、5.60 (1H, dd d, J=9.3, 6.1, 2.9 Hz)、5.36 (1H, dd, J=9.3, 2.7 Hz)、5.04 (1H, dd, J=10.3, 8.1 Hz)、5.04 (1H, br. d)、5.03 (1H, br. d)、4.88 (1H, ddd, J=12.0, 10.5, 4.7 Hz)、4.85 (1H, d, J=7.8 Hz)、4.76, 4.67 (each 1H, d, J=11.5 Hz)、4.71 (1H, d, J=6.1 Hz)、4.66 (1H, dd, J=10.3, 3.7 Hz)、4.59, 4.51 (each 1H, d, J=12.0 Hz)、4.32 (1H, dd, J=12.4, 2.4 Hz)、4.16 (1H, dd, J=11.0, 6.6 Hz)、4.11 (1H, dd, J=11.0, 7.1 Hz)、4.05 (1H, qlike)、4.04 (1H, tlike)、3.97 (1H, dd, J=12.2, 6.1 Hz)、3.95-3.88 (4H, m)、3.84 (1H, tlike)、3.79 (2H, t, J=6.3 Hz)、3.75 (3H, s)、3.70-3.56 (22H, m)、3.45 (2H, t, J=6.3 Hz)、2.58 (1H, dd, J=12.7, 4.7 Hz)、2.22, 2.11, 2.01, 1.9

50

6, 1. 96, 1. 85 (each 3H, s)、2. 07 (6H, s)、1. 72 (1H, dd, J=12. 7, 12. 0Hz)。

【0109】(4) 化合物8-4の合成

化合物2-3 (310mg) を溶解したテトラヒドロフラン (15ml) 溶液にハラジウム・炭素 (1.0%、100mg) と1N塩酸 (100μl) を加え、水素気流下、室温下で3時間攪拌した。反応液より触媒を濾別した後、濾液を濃縮し、残渣を分取用薄層クロマトグラフィー (塩化メチレン・メタノール 20:1) にて精製することにより化合物8-4 (234mg) を無色粉末として得た。

【0110】 $[\alpha]_D^{25} = -4.4^\circ$ (c 0.41, CHCl₃)

IR (KBr) : 3500, 1747, 1664cm⁻¹
¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8. 07 (2H, m)、7. 61 (1H, m)、7. 49 (2H, m)、5. 64 (1H, dd, J=9. 3, 6. 3, 2. 7Hz)、5. 34 (1H, dd, J=9. 3, 2. 7Hz)、5. 13 (1H, J=3. 4Hz)、4. 99 (1H, dd, J=10. 0, 8. 1Hz)、4. 97 (1H, m)、4. 86 (1H, d, J=8. 1Hz)、4. 75 (1H, dd, J=10. 0, 3. 4Hz)、4. 51 (1H, d, J=8. 5Hz)、4. 41 (1H, dd, J=12. 5, 2. 7Hz)、4. 37 (1H, dd, J=11. 0, 5. 9Hz)、4. 23 (1H, dd, J=11. 2, 7. 3Hz)、4. 18 (1H, dd, J=7. 3, 5. 9Hz)、3. 99 (1H, dd, J=12. 5, 6. 3Hz)、3. 96 (1H, t like)、3. 91 (1H, m)、3. 88 (1H, m)、3. 80 (3H, s)、3. 80 (2H, t, J=6. 1Hz)、3. 82-3. 70 (3H, m)、3. 68-3. 55 (21H, m)、3. 50 (2H, t, J=6. 1Hz)、3. 39 (1H, m)、2. 58 (1H, dd, J=12. 5, 4. 9Hz)、2. 26, 2. 14, 2. 12, 2. 07, 2. 03, 1. 97, 1. 95, 1. 81 (each 3H, s)、1. 54 (1H, dd, J=12. 5, 2. 5Hz)。

【0111】(5) 化合物8-5の合成

化合物8-4 (390mg) が溶解したメタノール (6ml) 溶液に、3%ナトリウムメトキシド・メタノール溶液 (600μl) を加え、室温下で30分間攪拌した。反応液を陽イオン交換樹脂 (Dowex 50w H⁺) により中和した後、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮した。次いで得られた残渣に1, 4-ジオキサン (1ml) と0. 1N水酸化ナトリウム水溶液 (6. 0ml) を加え、室温下で10分間攪拌した。その後陽イオン交換樹脂 (Dowex 50w H⁺) によって中和し、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮し、高分子ゲル

(200cc) を用いたカラムクロマトグラフィー (メタノール) にて精製することにより化合物8-5 (278mg) を無色粉末として得た。

【0112】 $[\alpha]_D^{25} = -12.2^\circ$ (c 1. 02, MeOH)

IR (KBr) : 3446, 1735, 1655cm⁻¹
¹H-NMR (CD₃OD) δ : 4. 50 (1H, d, J=8. 3Hz)、4. 45 (1H, d, J=7. 8Hz)、4. 05 (1H, dd, J=9. 8, 2. 9Hz)、3. 95-3. 55 (36H, m)、3. 81 (2H, t, J=6. 1Hz)、3. 51 (2H, t, J=6. 1Hz)、3. 50 (1H, m)、3. 40 (1H, m)、2. 79 (1H, dd, J=12. 9, 4. 2Hz)、2. 00, 1. 98 (each 3H, s)、1. 87 (1H, t like)。

【0113】(6) シアリル-N-アセチルラクトサミン修飾カルボキシメチルキトサン (化合物8) の合成

カルボキシメチルキトサン (40mg) と化合物8-5 (240mg) とを0. 5%炭酸水素ナトリウム水溶液 (3ml) に溶解した後、炭酸水素ナトリウム (20mg) を加え、60℃で160時間攪拌した。反応液を9. 5%エタノール (35ml) に加えて粗目的物を析出させた後、その析出物を9. 5%エタノール (40ml × 3回)、アセトン (40ml) およびジエチルエーテル (35ml) の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥した (42mg)。続いて、粗生成物を10mlの水に溶解した後、透析膜 (スペクトラノポア社製：分子量排除限界12000~14000) を用いて、精製水 (1000ml) を外液として室温下で12時間透析した。透析内液を9. 5%エタノール (140ml) に加えて目的物を析出させた後、その析出物を9. 5%エタノール (40ml)、アセトン (40ml) およびジエチルエーテル (40ml) の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥することによりシアリル-N-アセチルラクトサミン修飾カルボキシメチルキトサン (化合物8、28mg、ds : 0. 17、シアリル-N-アセチルラクトサミン含量: 29%) を得た (dsはシアリル酸の定量法であるレゾルシノール塩酸法にて求めた)。

【0114】実施例9

(1) 化合物9-1の合成

化合物1-3 (900mg) が溶解したジメチルホルムアミド溶液 (8ml) に、アジ化リチウム (81mg) を加え、65℃で3時間攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、塩化エチレンで希釈し、飽和食塩水にて洗浄し、次いで乾燥後溶媒を留去した。続いて、得られた残渣をシリカゲル (70g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化ニチレン・メタノール 50:1) にて精製することにより、化合物9-1 (810mg) を無色油状物として得た。

【0115】 $[\alpha]_D^{25} = -16. 0^\circ$ (c 1. 07, C

$\text{HC}_1\text{,}$)
IR ($\text{CHC}_1\text{,}$) : 2108, 1745, 1690 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.39 (1H, dd, δ , J = 8.5, 5.4, 2.7 Hz)、5.32 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz)、5.10 (1H, d, J = 9.3 Hz)、4.86 (1H, ddd, J = 12.2, 9.8, 4.6 Hz)、4.30 (1H, dd, J = 12.5, 2.7 Hz)、4.09 (1H, dd, J = 12.5, 5.4 Hz)、4.08 - 4.02 (2H, m)、3.90 (1H, ddd, J = 10.7, 5.1, 3.4 Hz)、3.80 (3H, s)、3.69 - 3.60 (20H, m)、3.46 (1H, ddd, J = 10.7, 6.6, 3.4 Hz)、3.39 (2H, t, J = 6.3 Hz)、2.62 (1H, dd, J = 12.9, 4.6 Hz)、2.14, 2.04, 2.03, 1.88 (each 3H, s)、1.98 (1H, dd, J = 12.9, 12.2 Hz)。

【0116】(2) 化合物9-2の合成

化合物9-1 (100 mg) が溶解したメタノール (5 ml) 溶液に、リンドラー触媒 (100 mg) とバラトルエンスルホン酸一水和物メタノール溶液 (25 mg) を加え、中圧水素気流下 (50 psi)、室温下で3時間搅拌した。反応液より触媒を滤去し、滤液を減圧下濃縮した後、残渣をシリカゲル (20 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化エチレン - メタノール - 水 7 : 3 : 1) にて精製することにより、化合物9-2 (103 mg) を無色油状物として得た。

【0117】 $[\alpha]_D^{25} - 12.4^\circ$ (c 1.01, C $\text{HC}_1\text{,}$)

IR ($\text{CHC}_1\text{,}$) : 1745, 1688 cm^{-1}
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.78 (2H, A₂B₂, J = 8.1 Hz)、7.16 (2H, A₂B₂, J = 8.1 Hz)、5.50 (1H, d, J = 9.0 Hz)、5.39 (1H, ddd, J = 8.5, 5.8, 2.9 Hz)、5.32 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz)、4.89 (1H, ddd, J = 12.5, 9.8, 4.6 Hz)、4.30 (1H, dd, J = 12.5, 2.7 Hz)、4.12 (1H, dd, J = 10.7, 2.0 Hz)、4.09 (1H, qlik e)、4.09 (1H, dd, J = 12.5, 5.9 Hz)、3.87 (1H, ddd, J = 11.0, 4.9, 3.2 Hz)、3.81 (2H, t, J = 5.0 Hz)、3.82 (3H, s)、3.74 - 3.60 (18H, m)、3.52 (1H, ddd, J = 11.0, 6.5, 2.5 Hz)、3.23 - 3.13 (2H, m)、2.64 (1H, dd, J = 12.5, 4.6 Hz)、2.35, 2.14, 2.13, 2.04, 2.02, 1.88 (each 3H, s)、1.93 (1

H, dd, J = 12.5, 12.5 Hz)。

【0118】(3) カルボキシメチルブルランの調製

特願平5-38635号に記載される方法 (ブルラン (平均分子量: 15万) とクロル酸とを1N水酸化ナトリウム水溶液中で反応させる) によりカルボキシメチルブルラン (カルボキシメチル化度: 0.6)を得た。

【0119】(4) シアル酸修飾カルボキシメチルブルラン (9) の合成

カルボキシメチルブルラン (50 mg) と化合物9-2 (1.15 mg) を溶解した水 (2ml) とN, N'-ジメチルホルムアミド (2ml) の混合溶液に、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン (EDQ, 610 mg) を加え、60°Cで160時間搅拌した後、反応液を濃縮し、残渣に1N水酸化ナトリウム水溶液 (5ml) を加えて、更に12時間搅拌した。反応混合物を9.5%エタノール (35ml) に加えて粗目的物を析出させた後、その析出物を9.5%エタノール (40ml × 3回)、アセトン (40ml) およびジエチルエーテル (40ml) の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥した (63 mg)。

【0120】続いて、粗生成物を10mlの水に溶解した後、透析膜 (スペクトラ/ポア社製: 分子量排除限界 12000 ~ 14000) を用いて、精製水 (1000 ml) を外液として室温下で16時間透析した。透析内液を9.5%エタノール (140ml) に加えて目的物を析出させた後、その析出物を9.5%エタノール (40ml × 3回)、アセトン (40ml) およびジエチルエーテル (40ml) の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥することによりシアル酸修飾カルボキシメチルブルラン (化合物9, 43 mg, ds : 0.12, シアル酸含量: 13.5%)を得た (dsはレゾルシノール塩酸法により算出した)。

【0121】実施例10

(1) 化合物10-1の合成

化合物7-6 (750 mg) が溶解したジメチルホルムアミド溶液 (3ml) に、アジダナトリウム (92.5 mg, 1.42 mmol) を加え、70°Cで17時間搅拌した。反応液を室温まで冷却した後、塩化エチレンで希釈し、飽和食塩水にて洗浄し、次いで乾燥後溶媒を除去した。続いて、得られた残渣をシリカゲル (150 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化エチレン - メタノール 100 : 1) にて精製することにより、化合物10-1 (674 mg) を無色非晶質として得た。

【0122】 $[\alpha]_D^{25} - 31.0^\circ$ (c 1.07, C $\text{HC}_1\text{,}$)

IR ($\text{CHC}_1\text{,}$) : 3450, 2106, 1674 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$) δ : 7.41 - 7.26 (20H, m)、6.13 (1H, d, J =

J

7. 6 Hz)、4. 98 (1H, d, J=3. 4 Hz)
 2)、4. 95, 4. 61 (each 1H, d, J=11. 5 Hz)、4. 84 (1H, d, J=8. 5 Hz)
 2)、4. 81, 4. 79, 4. 75, 4. 67 (each 1H, d, J=11. 7 Hz)、4. 62, 4.
 58 (each 1H, d, J=12. 2 Hz)、4.
 13 (1H, q, J=6. 6 Hz)、4. 06 (1H,
 d d, J=10. 2, 3. 4 Hz)、3. 97 (1H,
 m)、3. 95 (1H, m)、3. 85-3. 77 (2
 H, m)、3. 76-3. 56 (23H, m)、3. 5
 2-3. 43 (3H, m)、3. 36 (2H, t, J=5.
 0 Hz)、1. 66 (3H, s)、1. 14 (3
 H, J=6. 6 Hz)。

【0123】(2) 化合物10-2の合成

モレキュラーシーブズ4A (3 g) を含む塩化メチレン溶液 (10 ml) に化合物7-7 (350 mg) および化合物10-1 (542 mg) を溶解し、室温で2時間攪拌した後、0°Cで3フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (87 μl) を加え、同温度で30分間攪拌した。反応液を濾過した後、濾液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、乾燥後溶媒を減圧下留去した。得られた残渣を、シリカゲル (70 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化エチレン-メタノール 20:1) にて精製することにより、化合物10-2 (242 mg) を無色粉末として得た。

【0124】 $[\alpha]_D^{25} = -27. 9^\circ$ (c 0. 55, C
 HC1s)

IR (KBr) 2108, 1745, 1685 cm⁻¹
¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7. 97 (2H,
 m)、7. 50 (1H, m)、7. 49-7. 16 (2
 2H, m)、6. 25 (1H, b r. s)、5. 59

(1H, d d d, J=9. 3, 5. 6, 2. 7 Hz)、
 5. 37 (1H, d d, J=9. 3, 2. 7 Hz)、
 5. 22 (1H, d, J=3. 7 Hz)、5. 07 (1
 H, d, J=10. 3 Hz)、5. 04 (1H, d, J
 =3. 7 Hz)、4. 97 (1H, d d, J=10.
 0, 8. 1 Hz)、4. 92, 4. 63 (each 1
 H, d, J=11. 7 Hz)、4. 90 (1H, d d
 d, J=12. 0, 10. 5, 4. 6 Hz)、4. 81

(1H, d, J=8. 1 Hz)、4. 74 (1H,
 d)、4. 81, 4. 77, 4. 75, 4. 70, 4.
 58, 4. 44 (each 1H, d, J=12. 0 Hz)
 2)、4. 67 (1H, d d, J=10. 0, 3. 7 Hz)
 2)、4. 29 (1H, d d, J=12. 4, 2. 7 Hz)
 2)、4. 24 (1H, d d, J=11. 0, 6. 8 Hz)
 2)、4. 23 (1H, q, J=6. 6 Hz)、4. 1
 6 (1H, d d, J=11. 0, 7. 3 Hz)、4. 0
 8 (1H, m)、4. 08 (1H, d d, J=10.
 0, 3. 7 Hz)、4. 04 (1H, m)、4. 01
 (1H, m)、3. 93 (1H, d d, J=12. 4,

5. 6 Hz)、3. 90 (1H, m)、3. 87 (1
 H, d d, J=10. 0, 2. 7 Hz)、3. 87-
 3. 79 (4H, m)、3. 75 (3H, s)、3. 6
 5 (2H, t, J=5. 1 Hz)、3. 65-3. 48
 (21H, m)、3. 37 (2H, t, J=5. 1 H
 z)、2. 56 (1H, d d, J=12. 7, 4. 6 H
 z)、2. 22, 2. 08, 2. 07, 2. 01, 1.
 97, 1. 96, 1. 89, 1. 85 (each 3
 H, s)、1. 71 (1H, d d, J=12. 7, 1
 2. 0 Hz)、1. 10 (3H, d, J=6. 6 H
 z)。

【0125】(3) 化合物10-3の合成

化合物10-2 (200 mg) を溶解したメタノール
 (15 ml) 溶液に、パラジウム-炭素 (10%, 15

0 mg) と 0. 5 N 塩酸 (328 μl) を加え、中圧水素気流下 (50 psi)、室温下で12時間攪拌した。反応液より触媒を濾別した後、濾液を濃縮し、残渣をシリカゲル (45 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン-メタノール-水 65:3.5:10 (下層)) にて精製することにより化合物10-3 (1
 40 mg) を無色粉末として得た。

【0126】 $[\alpha]_D^{25} = -58. 3^\circ$ (c 0. 52, C
 HC1s)

IR (KBr) : 3420, 1749, 1663 cm⁻¹
¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8. 05 (2H,
 m)、7. 63 (1H, m)、7. 51 (2H, t i
 ke)、5. 60 (1H, d d d, J=9. 3, 5.
 6, 2. 9 Hz)、5. 37 (1H, d d, J=9.
 3, 2. 7 Hz)、5. 17 (1H, d, J=3. 4 H
 z)、5. 06 (1H, d, J=3. 9 Hz)、4. 9
 8 (1H, d d, J=10. 0, 8. 3 Hz)、4. 9
 1 (1H, d, J=8. 3 Hz)、4. 87 (1H,
 m)、4. 86-4. 81 (1H, m)、4. 60 (1
 H, d d, J=10. 0, 3. 4 Hz)、4. 52 (1
 H, d d, J=10. 5, 5. 9 Hz)、4. 45 (1
 H, d, J=8. 5 Hz)、4. 41 (1H, d d, J
 =12. 7, 2. 9 Hz)、4. 15 (1H, d d, J
 =10. 5, 8. 5 Hz)、4. 09-3. 99 (4
 H, m)、3. 95 (1H, d d, J=10. 5, 1
 0. 5 Hz)、4. 16 (1H, d d, J=12. 0,
 4. 9 Hz)、3. 85 (1H, m)、3. 84-3.
 79 (5H, m)、3. 74 (3H, s)、3. 76-
 3. 62 (22H, m)、3. 42 (1H, m)、3.
 22 (1H, d d d, J=13. 7, 6. 1, 4. 6 H
 z)、3. 15 (1H, d d d, J=13. 7, 10.
 0, 5. 1 Hz)、2. 58 (1H, d d, J=12.
 4, 4. 6 Hz)、2. 26, 2. 16, 2. 08,
 2. 07, 2. 04, 1. 99, 1. 97, 1. 81
 (each 3H, s)、1. 53 (1H, d d, J=1
 2. 4, 12. 2 Hz)、1. 27 (3H, d, J=

6. 8 Hz)。

【0127】(4) シアリルルイスX修飾カルボキシメチルブルラン(化合物10)の合成
カルボキシメチルブルラン(50 mg)と化合物10-3(184 mg, 0.124 mmol)を溶解した水(2 ml)とN,N'-ジメチルホルムアミド(2 ml)の混合溶液に、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン(EDQ, 610 mg)を加え、40°Cで160時間攪拌した後、反応液を濃縮し、残渣に1N水酸化ナトリウム水溶液(7 ml)を加えて、更に12時間攪拌した。反応混合物を9.9.5%エタノール(35 ml)に加えて粗目的物を析出させた後、その析出物を9.5%エタノール(40 ml×3回)、アセトン(40 ml)およびジエチルエーテル(40 ml)の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥した(83 mg)。

【0128】続いて、粗生成物を10 mlの水に溶解した後、透析膜(スペクトラノポア社製:分子量排除限界12000~14000)を用いて、精製水(1000 ml)を外液として室温下で16時間透析した。透析内液を9.9.5%エタノール(140 ml)に加えて目的物を析出させた後、その析出物を9.5%エタノール(40 ml×3回)、アセトン(40 ml)およびジエチルニーテル(40 ml)の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥することによりシアリルルイスX修飾カルボキシメチルブルラン(化合物10, 5.7 mg, d_s:0.13, シアリルルイスX含量:31%)を得た(d_sはシリアル酸の定量法であるレゾルシノール塩酸法にて求めた)。

【0129】実施例11

(1) 化合物11-1の合成

化合物8-2(620 mg)が溶解したジメチルホルムアミド溶液(6 ml)に、アジ化リチウム(83 mg, 1.70 mmol)を加え、70°Cで12時間攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、塩化メチレンで希釈し、飽和食塩水にて洗浄し、次いで乾燥後溶媒を留去した。繰り返して、得られた残渣をシリカゲル(150 g)を用いるカラムクロマトグラフィー(塩化メチレン-メタノール 70:1)にて精製することにより、化合物11-1(5.75 mg)を無色非晶質として得た。

【0130】[α]_D²⁵-14.3 (c 1.02, CHCl₃)

IR (CHCl₃): 2108, 1674 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃): δ: 7.37-7.26 (1OH, m), 6.33 (1H, t r. s), 4.82 (1H, d, J=8.3 Hz), 4.77, 4.71 (each 1H, d, J=11.5 Hz), 4.61, 4.57 (each 1H, d, J=12.2 Hz), 3.89 (1H, m), 3.80-3.72 (4H, m), 3.71-3.57 (22H, m), 3.5

1 (1H, d t, J=9.5, 4.9 Hz), 3.36 (2H, t, J=5.1 Hz), 2.15 (1H, d, J=2.2 Hz, OH), 1.96, 1.70 (each 3H, s)。

【0131】(2) 化合物11-2の合成

モレキニラーシーズ4A(2 g)を含む塩化メチレン溶液(5 ml)に化合物7-7(200 mg)、化合物11-1(350 mg)を溶解し、室温下で2時間攪拌した後、0°Cで3フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体(50 μl)を加え、同温度で3時間攪拌した。反応液を濾過した後、濾液を饱和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、乾燥後溶媒を減圧下留去した。得られた残渣を、シリカゲル(45 g)を用いるカラムクロマトグラフィー(塩化メチレン-メタノール 15:1)により精製して、化合物11-2(145 mg)を無色粉末として得た。

【0132】[α]_D²⁵-20.9° (c 1.05, CHCl₃)

IR (CHCl₃): 2103, 1744, 1682 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃): δ: 7.96 (2H, d like), 7.53 (1H, t like), 7.38 (2H, t like), 7.35-7.18 (10H, m), 6.32 (1H, b r. s), 5.60 (1H, d d, J=9.3, 6.1, 2.7 Hz), 5.36 (1H, d d, J=9.3, 2.7 Hz), 5.09-5.00 (3H, m), 4.89 (1H, d d d, J=12.0, 10.7, 4.6 Hz), 4.85 (1H, d, J=8.3 Hz), 4.77, 4.67 (each 1H, d, J=11.5 Hz), 4.71 (1H, d, J=6.1 Hz), 4.66 (1H, d d, J=10.3, 3.7 Hz), 4.59, 4.51 (each 1H, d, J=12.0 Hz), 4.31 (1H, b r. d), 4.16 (1H, d d, J=11.0, 6.8 Hz), 4.11 (1H, d d, J=11.0, 7.3 Hz), 4.05 (1H, q like), 4.04-4.03 (1H, m), 3.97 (1H, d d, J=12.7, 6.1 Hz), 3.95-3.86 (4H, m), 3.84 (1H, t like), 3.78 (2H, t, J=6.3 Hz), 3.75 (3H, s), 3.70-3.56 (22H, m), 3.37 (2H, t, J=5.1 Hz), 2.58 (1H, d d, J=12.7, 4.6 Hz), 2.22, 2.10, 2.01, 1.85 (each 3H, s), 2.07, 1.96 (6H, s), 1.72 (1H, d d, J=12.7, 12.3 Hz)。

【0133】(3) 化合物11-3の合成

化合物11-2(100 mg)を溶解したメタノール(10 ml)溶液に、パラジウム-炭素(10%, 50 mg)と1N塩酸(99 μl)を加え、水素気流下、室

温下で12時間攪拌した。反応液より触媒を濾別した後、濾液を濃縮し、残渣をシリカゲル(20g)を用いるカラムクロマトグラフィー(塩化メチレン-メタノール-水 65:35:10(下層))にて精製することにより化合物11-3(65mg)を無色粉末として得た。

【0134】 $[\alpha]_D^{25} = -3.4^\circ$ (c 1.04, CHCl₃)

IR (KBr) : 3480, 3420, 1743, 1688 cm⁻¹

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8.07 (2H, d like), 7.62 (1H, t like), 7.48 (2H, t like), 5.63 (1H, ddd, J=9.5, 5.9, 2.7 Hz), 5.36 (1H, d

d, J=9.5, 2.4 Hz), 5.14 (1H, d, J=3.2 Hz), 5.00 (1H, dd, J=10.0, 8.3 Hz), 4.88 (1H, m), 4.85 (1H, d, J=8.3 Hz), 4.73 (1H, d, J=10.3, 3.2 Hz), 4.40 (1H, d, J=8.5 Hz), 4.39 (1H, dd, J=12.7, 2.7 Hz), 4.36 (1H, dd, J=11.2, 5.8 Hz), 4.30 (1H, dd, J=11.2, 7.3 Hz), 4.17 (1H, t like), 4.05 (1H, m), 3.99 (1H, dd, J=12.2, 5.9 Hz), 3.97 (1H, dd, J=10.3, 10.3 Hz), 3.93 (1H, m), 3.89 (1H, d like), 3.83-3.52 (25H, m), 3.80 (3H, s), 3.41 (1H, m), 3.23 (1H, ddd, J=13.2, 7.1, 3.9 Hz), 3.11 (1H, ddd, J=13.2, 5.9, 3.4 Hz), 2.58 (1H, dd, J=12.4, 4.6 Hz), 2.31, 2.14, 2.12, 2.07, 2.03, 1.97, 1.97, 1.81 (each 3H, s), 1.54 (1H, dd, J=12.5, 12.0 Hz)。

【0135】 (4) シアリル-N-アセチルラクトサミン修飾カルボキシメチルブルラン(化合物11)の合成
カルボキシメチルブルラン(40mg)と化合物11-3(133mg)を溶解した水(1.6ml)とN,N'-ジメチルホルムアミド(1.6ml)の混合溶液に、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン(EDQ, 490mg)を加え、40℃で160時間攪拌した後、反応液を濃縮し、残渣に1N水酸化ナトリウム水溶液(6ml)を加えて、更に12時間攪拌した。反応混合物を99.5%エタノール(35ml)に加えて粗目的物を析出させた後、その析出物を95%エタノール(40ml×3回)、アセトン(40ml)およびジエチルエーテル(40ml)の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥した(48mg)。

【0136】 続いて、粗生成物を10mlの水に溶解し

た後、透析膜(スペクトラ/ボア社製:分子量排除限界12000~14000)を用いて、精製水(1000ml)を外液として室温下で16時間透析した。透析内液を99.5%エタノール(140ml)に加えて目的物を析出させた後、その析出物を95%エタノール(40ml×3回)、アセトン(40ml)およびジエチルエーテル(40ml)の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥することによりシアリル-N-アセチルラクトサミン修飾カルボキシメチルブルラン(化合物11, 40mg, d.s.: 0.13, シアリル-N-アセチルラクトサミン含量: 27%)を得た(d.s.はシアル酸の定量法であるレゾルシノール塩酸法にて求めた)。

【0137】 実施例12

カルボキシメチルキトサン(50mg)を蒸留水10mlに溶かし、ラクトースー水和物(C₁₂H₂₂O₁₁: H₂O=360.31)313mgを加え、次いで反応液に酢酸を加えてpH 6.6に調整した。この反応液にNaBH₄CN(95%, Mw=62.84)72mgを加え、室温下で1週間攪拌した。反応液を透析膜(スペクトラ/ボア社製:分子量カットオフ12,000~14,000)を用いて、精製水を外液として4℃で2日間透析した。透析内液は、さらにメンプランフィルター(0.22μm)を通した。この溶出液を99.5%エタノール280mlに加え、生じた沈殿を95%エタノール、アセトン、エーテルの順で洗浄し、減圧下乾燥することによりラクトースの導入された化合物(51mg)を白色非晶質として得た。ガラクトースを標準とするフェノール硫酸法によって定量したところ、ラクトースの置換度は0.15であった。

【0138】 上記のラクトースの導入された化合物(20mg)を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液5mlに溶かし、無水酢酸80μlを4回に分けて加え、室温下で一晩攪拌した。反応液を透析膜(スペクトラ/ボア社製:分子量カットオフ12,000~14,000)を用いて、精製水を外液として4℃で2日間透析した。透析内液は、さらにメンプランフィルター(0.22μm)を通した。この溶出液を99.5%エタノール150mlに加え、生じた沈殿を95%エタノール、アセトン、エーテルの順で洗浄し、減圧下乾燥することにより、ラクトースが導入され、カルボキシメチルキトサンのアミノ基がアセチル化された化合物(13mg)を白色非晶質として得た。

【0139】 実施例13

カルボキシメチルキトサン(100mg)を蒸留水10mlに溶かし、マルトースー水和物(C₁₂H₂₂O₁₁: H₂O=360.32)641mgを加え、次いで反応液に希酢酸を加えてpH 6.6に調整した。この反応液にNaBH₄CN(95%, Mw=62.84)140mgを加え、室温下で6日間攪拌した。反応液を透析膜(スペクトラ/ボア社製:分子量カットオフ12,000

0～14,000)を用いて、精製水を外液として4℃で2日間透析した。透析内液は、さらにメンプランフィルター(0.22μm)を通した。この溶出液を9.9.5%エタノール300mlに加え、生じた沈殿を9.5%エタノール、アセトン、エーテルの順で洗浄し、減圧下乾燥することによりマルトースの導入された化合物(1.20mg)を白色非晶質として得た。グルコースを標準とするフニノール硫酸法によって定量したところ、マルトースの置換度は0.26であった。

【0140】上記のマルトースの導入された化合物(3.0mg)を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液3mlに溶かし、無水酢酸120μlを4回に分けて加え、室温下で一晩攪拌した。反応液を透析膜(スペクトラ/ポア社製・分子量カットオフ12,000～14,000)を用いて、精製水を外液として4℃で2日間透析した。透析内液は、さらにメンプランフィルター(0.22μm)を通した。この溶出液を9.9.5%エタノール15.0mlに加え、生じた沈殿を9.5%エタノール、アセトン、エーテルの順で洗浄し、減圧下乾燥することにより、マルトースが導入され、カルボキシメチルキトサンのアミノ基がアチセル化された化合物(3.0mg)を白色非晶質として得た。

【0141】実施例14

カルボキシメチルキトサン(5.0mg)を蒸留水10mlに溶かし、マルトペンタオース($C_{30}H_{52}O_{16}$ =828.73)7.20mgを加え、次いで反応液に希酢酸を加えてpH6.5に調整した。この反応液にNaBH₄CN(9.5%, Mw=62.84)7.2mgを加え、室温下で6日間攪拌した。反応液を透析膜(スペクトラ/ポア社製・分子量カットオフ12,000～14,000)を用いて、精製水を外液として4℃で2日間透析した。透析内液は、さらにメンプランフィルター(0.22μm)を通した。この溶出液を9.9.5%エタノール25.0mlに加え、生じた沈殿を9.5%エタノール、アセトン、エーテルの順で洗浄し、減圧下乾燥することによりマルトペンタオースの導入された化合物(6.3mg)を白色非晶質として得た。マルトテトラオースを標準とするフニノール硫酸法によって定量したところ、マルトペンタオースの置換度は0.12であった。

【0142】上記のマルトペンタオースの導入された化合物(3.0mg)を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液3mlに溶かし、無水酢酸120μlを4回に分けて加え、室温下で一晩攪拌した。反応液を透析膜(スペクトラ/ポア社製・分子量カットオフ12,000～14,000)を用いて、精製水を外液として4℃で2日間透析した。透析内液は、さらにメンプランフィルター(0.22μm)を通した。この溶出液を9.9.5%エタノール10.0mlに加え、生じた沈殿を9.5%エタノール、アセトン、エーテルの順で洗浄し、減圧下乾燥することにより、マルトペンタオースが導入され、カルボキシメチ

ルキトサンのアミノ基がアチセル化された化合物(2.6mg)を白色非晶質として得た。

【0143】実施例15

ラクトース水和物の代わりにマルトトリオースを用いた以外は、実施例12に記載される方法と同様の方法でマルトトリオース導入カルボキシメチルキトサン複合体を得た。

【0144】実施例16

ラクトース水和物の代わりにセロビオースを用いた以外は、実施例12に記載される方法と同様の方法でセロビオース導入カルボキシメチルキトサン複合体を得た。

【0145】実施例17

ラクトース水和物の代わりにキトビオースを用いた以外は、実施例12に記載される方法と同様の方法でキトビオース導入カルボキシメチルキトサン複合体を得た。

【0146】実施例18

(1) カルボキシメチルキトサン-ペプチド複合体の調製
実施例1(5)のカルボキシメチルキトサン(3.20mg)を0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(3.2ml)に溶解後、ジメチルホルムアミド(2.8ml)を加えて均一な多糖溶液とした。一方、3-(p-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸(デアミノチロシン)(1.1mg)を0.6mlのジメチルホルムアミドに溶解後N-ヒドロキシスクシンイミド(7.6mg)とN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(12.0mg)を加え、室温下で2時間反応させて活性エステルとした。この活性エステルを含む反応液の全量を上記の多糖溶液に加え、4℃で18時間反応させた。反応液をエタノール(25.6ml)中に加えて析出した沈殿を集め、減圧下乾燥して2.80mgのカルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン複合体を得た。本複合体のデアミノチロシンの含量は、紫外外部(276nm)の吸光度分析から、0.43%(重量%)であった。

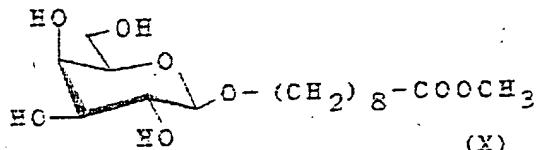
【0147】上記複合体(1.20mg)を0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(1.2ml)に溶解後、ジメチルホルムアミド(1.0.5ml)を加えて均一な多糖溶液とした。一方、tert-ブトキシカルボニル基(Boc基)で保護されたペプチドN-Boc-Gly-Gly-Gly-OH(3.4mg)を0.9mlのジメチルホルムアミドに溶解後、N-ヒドロキシスクシンイミド(13.8mg)とN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(22.2mg)を加え、室温下で4時間反応させて活性エステルとした。この活性エステルを含む反応液の全量を上記の多糖溶液に加え、4℃で18時間反応させた。反応液をエタノール(8.0ml)中に加えて析出した沈殿を集め、減圧下乾燥して1.11mgのカルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン-Gly-Gly-Gly-OH-Boc複合体を得た。

【0148】(2) 9-(ガラクトシル-β)ノナン酸の調製

R.U.Lemieux, D.R.Bundle, D.A.Bekerらの米国特許第4238473(1980)に記載の方法に従って下記式(X)の化合物を合成した。

【0149】

【化6】



10

【0150】この化合物(350mg)が溶解したメタノール(5ml)-テトラヒドロフラン(4ml)の混合溶液に、1N水酸化ナトリウム水溶液(1.2ml)を加え、室温下で18時間攪拌した。反応液を陽イオン

交換樹脂(Amberlite IR-120B(H⁺))により中和した後、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮することにより目的物(327mg)を無色固体として得た。

【0151】m.p. 107.5-109°C

Anal. Calcd for C₂₅H₄₂O₆ · 1/3H₂O: C, 51.74; H, 8.11.

Found: C, 51.76; H, 8.25.

[α]_D²⁵ -10.3° (c 1.0, MeOH)

IR (KBr): 3420, 1730, 1740, 1635 cm⁻¹

¹H-NMR (CD₃OD) δ: 4.20 (1H, s, J=8.0 Hz), 3.89 (1H, d, t, J=8.5, 7.0 Hz), 3.83 (1H, d, J=3.5 Hz), 3.69-3.78 (2H, m), 3.53 (1H, d t, J=8.5, 7.0 Hz), 3.46-3.52 (2H, m), 3.45 (1H, dd, J=9.5, 3.5 Hz), 2.26 (2H, t, 7.0 Hz), 1.66-1.55 (4H, m), 1.44-1.30 (8H, m)。FAB-MS m/z: 859 (M+Na⁺)。

【0152】(3) ガラクトース導入カルボキシメチルキトサン-ペプチド複合体の調製

カルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン-Gly-Gly-Gly-Boc複合体(60mg)を0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(6ml)に溶解後、ジメチルホルムアミド(5.3ml)を加えて均一な多糖溶液とした。一方、9-(ガラクトシル-β)-ノナン酸(Gal-O-C₈H₁₆COOH)(60.6mg)を

1.2mlのジメチルホルムアミドに溶解後、N-ヒドロキシスクシンイミド(21mg)とN,N'-ジシクロヘキシカルボジイミド(36mg)を加え、室温下で18時間反応させて活性エステルとした。この活性エステルを含む反応液の全量を上記の多糖溶液に加え、室温下で3日間反応させた。反応液をエタノール(48ml)中に加えて析出した沈殿を集め、減圧下乾燥して5mgのガラクトース導入カルボキシメチルキトサン-

デアミノチロシン-Gly-Gly-Gly-Boc複合体を得た。本複合体のガラクトース-O-C₈H₁₆C-Oの含量はフェノール硫酸法で分析(吸光度490nm)したところ5.6%(重量%)であった。再度同様の条件でガラクトースの導入を行い、同複合体を49.6mg(11%)得た。

【0153】上記複合体(47.6mg)を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(5ml)に溶解後、無水酢酸(0.2ml)を加えて室温下で5時間N-アセチル化した。反応液を中和した後、エタノール(20ml)中に加え、析出した沈殿物を集め減圧下乾燥して、43.7mgのガラクトース導入N-アセチルカルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン-Gly-Gly-Gly-Boc複合体を得た。

【0154】(4) 薬物の導入

上記複合体(20mg)を0.5N塩酸(2ml)に溶解後、30°Cで16時間かけてBoc基の脱保護を行った。反応液を中和後、エタノール(8ml)中に加え、析出した沈殿物を集め減圧下乾燥して、15.8mgのガラクトース導入N-アセチルカルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン-Gly-Gly-Gly-NH₂複合体を得た。

【0155】50.5mgのメトトレキサート(MTX)をジメチルホルムアミド(1ml)に溶解後、N,N'-ジシクロヘキシカルボジイミド(20.5mg)を加え、4°Cで17時間反応させ、その反応液にN-ヒドロキシスクシンイミド(9.2mg)とピリジン(12.6ml)を加え室温下で5時間反応させてMTXの活性エステルを調製した。

【0156】他方、上記のガラクトース導入N-アセチルカルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン-Gly-Gly-Gly-NH₂複合体(15mg)を0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(3ml)に溶解後、上記のMTXの活性エステルを含む反応液340mlを加えて、室温下で3時間反応させた。得られた反応液をエタノール(20ml)に加えて析出した沈殿物を集め減圧下乾燥して、12.2mgのガラクトース導入N-アセチルカルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン-Gly-Gly-Gly-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は、紫外部(308nm)の吸光度分析から、13.5%(重量%)であった。

【0157】実施例19

(1) カルボキシメチルキトサン-ペプチド複合体の調製
実施例1(5)のカルボキシメチルキトサン(192mg)を0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(19.2ml)に溶解後、ジメチルホルムアミド(16.8ml)を加えて均一な多糖溶液とした。一方、3-(p-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸(デアミノチロシン)(6.6mg)を0.36mlのジメチルホルムアミド

50

41

に溶解後N-ヒドロキシスクシンイミド(4.56mg)とN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(7.2mg)を加え、室温下で2時間反応させて活性エステルとした。この活性エステルを含む反応液の全量

を上記の多糖溶液に加え、4°Cで18時間反応させた。反応液をエタノール(150ml)中に加えて析出した沈殿を集め、減圧下乾燥して177mgのカルボキシメチルキトサン・デアミノチロシン複合体を得た。本複合体のデアミノチロシンの含量は、紫外部(276nm)の吸光度分析から、0.37%(重量%)であった。

【0158】上記複合体(40mg)を0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(4ml)に溶解後、ジメチルホルムアミド(3.5ml)を加えて均一な多糖溶液とした。他方、Boc基で保護されたペプチドN-Boc-

Gly-Phe-Gly-OH(18mg)を0.3mlのジメチルホルムアミドに溶解後、N-ヒドロキシスクシンイミド(4.6mg)とN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(7.4mg)を加え、室温下で4.5時間反応させて活性エステルとした。この活性エステルを含む反応液の全量を上記の多糖溶液に加え、4°Cで18時間反応させた。反応液をエタノール(32ml)中に加えて析出した沈殿を集め、減圧下乾燥して37.1mgのカルボキシメチルキトサン・デアミノチロシン-Gly-Gly-Phe-Gly-Boc複合体を得た。本複合体のペプチドの含量は、紫外部(258nm)の吸光度分析から、7.3%(重量%)であった。

【0159】(2) ガラクトース導入カルボキシメチルキトサン-ペプチド複合体の調製

上記複合体(35mg)を0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(5.25ml)に溶解後、ジメチルホルムアミド(4.6ml)を加えて均一な多糖溶液とした。一方、9-(ガラクトシル-β)-ノナン酸(実施例

(2))(35.4mg)を0.7mlのジメチルホルムアミドに溶解後、N-ヒドロキシスクシンイミド(12.3mg)とN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(21mg)を加え、室温下で18時間反応させて活性エステルとした。この活性エステルを含む反応液の全量を上記の多糖溶液に加え、室温下で3日間反応させた。反応液をエタノール(28ml)中に加えて析出した沈殿を集め、減圧下乾燥して33.6mgのガラクトース導入カルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン-Gly-Gly-Phe-Gly-Boc複合体を得た。本複合体のガラクトース-O-C₆H₁₁COの含量はフニノール硫酸法で分析(吸光度490nm)し、7.2%(重量%)であった。上記複合体(32.4mg)を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(4ml)に溶解後、無水酢酸(0.16ml)を加えて室温下で5時間N-アセチル化した。反応液を中和した後、エタノール(16ml)中に加え、析出した沈殿物を集め減圧下乾

10

燥して、32.9mgのガラクトース導入N-アセチルカルボキシメチルキトサン・デアミノチロシン-Gly-Gly-Phe-Gly-Boc複合体を得た。

【0160】(3) 薬物の導入

上記複合体(32.9mg)を0.5N塩酸(3.5ml)に溶解後、37°Cで16時間かけてBoc基の脱保護を行った。反応液を中和後、エタノール(16ml)中に加え、析出した沈殿物を集め減圧下乾燥して、32.6mgのガラクトース導入N-アセチルカルボキシメチルキトサン・デアミノチロシン-Gly-Gly-Phe-Gly-NH₂複合体を得た。

【0161】上記複合体(20mg)を0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(4ml)に溶解後、実施例18と同様にして調製したMTXの活性エステルを含む反応液

400mlを加えて、室温下で3時間反応させた。得られた反応液をエタノール(24ml)に加えて析出した沈殿物を集め減圧下乾燥して、18.3mgのガラクトース導入N-アセチルカルボキシメチルキトサン・デアミノチロシン-Gly-Gly-Phe-Gly-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は、紫外部(308nm)の吸光度分析から、8.3%(重量%)であった。また、本複合体におけるペプチドに対するMTXのモル比は、1.1と算出された。

【0162】実施例20

(1) カルボキシメチルキトサン-ペプチド複合体の調製
実施例1(5)のカルボキシメチルキトサン(160mg)を0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(16ml)に溶解後、ジメチルホルムアミド(14ml)を加えて均一な多糖溶液とした。一方、3-(p-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸(デアミノチロシン)(16mg)を0.8mlのジメチルホルムアミドに溶解後N-ヒドロキシスクシンイミド(11mg)とN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(17.4mg)を加え、室温下で2時間反応させて活性エステルとした。この活性エステルを含む反応液の全量を上記の多糖溶液に加え、4°Cで18時間反応させた。反応液をエタノール(128ml)中に加え、析出した沈殿を集め、減圧下乾燥して135mgのカルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン複合体を得た。本複合体のデアミノチロシンの含量は、紫外部(276nm)の吸光度分析から、1.1%(重量%)であった。

【0163】上記複合体(100mg)を0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(10ml)に溶解後、ジメチルホルムアミド(8.75ml)を加えて均一な多糖溶液とした。一方、Boc基で保護されたペプチドN-Boc-Phe-Phe-Gly-OH(47mg)を0.5mlのジメチルホルムアミドに溶解後、N-ヒドロキシスクシンイミド(11.5mg)とN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(18.5mg)を加え、室温下で3時間反応させて活性エステルとした。この活性

50

42

43

エステルを含む反応液の全量を上記の多糖溶液に加え、4°Cで18時間反応させた。反応液をエタノール(80mL)中に加えて析出した沈殿を集め、減圧下乾燥して64.2mgのカルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン-Gly-Phe-Phe-Boc複合体を得た。本複合体のペプチドの含量は、紫外部(258nm)の吸光度分析から、13%(重量%)であった。

[0164] (2) ガラクトース導入カルボキシメチルキトサン-ペプチド複合体の調製

上記複合体(20mg)を0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(2mL)に溶解後、ジメチルホルムアミド(1.75mL)を加えて均一な多糖溶液とした。一方、9-(ガラクトシル-β)-ノナン酸(実施例

(2))(20.2mg)を0.4mLのジメチルホルムアミドに溶解後、N-ヒドロキシスクシンイミド(7mg)とN,N'-ジシクロヘキシカルボジイミド(12mg)を加え、室温下で19.5時間反応させて活性エステルとした。この活性エステルを含む反応液の全量を上記の多糖溶液に加え、室温下で3日間反応させた。反応液をエタノール(1.6mL)中に加えて析出した沈殿を集め、減圧下乾燥して21mgのガラクトース導入カルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン-Gly-Phe-Phe-Boc複合体を得た。本複合体のガラクトース-O-C₆H₁₁COの含量をフェノール硫酸法で分析(吸光度490nm)したところ9.5%(重量%)であった。

[0165] 上記複合体(19mg)を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(2mL)に溶解後、無水酢酸(0.08mL)を加えて室温下で5時間N-アセチル化した。反応液を中和した後、エタノール(8mL)中に加え、析出した沈殿物を集め減圧下乾燥して、17.5mgのガラクトース導入N-アセチルカルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン-Gly-Phe-Phe-Boc複合体を得た。

[0166] (3) 薬物の導入

上記複合体(16.8mg)を0.5N塩酸(3mL)に溶解後、37°Cで24時間Boc基の脱保護を行つた。反応液を中和した後、エタノール(8mL)中に加え、析出した沈殿物を集め減圧下乾燥して、11.5mgのガラクトース導入N-アセチルカルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン-Gly-Phe-Phe-NH₂複合体を得た。

[0167] 上記複合体(11.5mg)を0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液(3mL)に溶解後、実施例18と同様にして調製したMTXの活性エステルを含む反応液300uLを加えて、室温下で3時間反応させた。得られた反応液をエタノール(18mL)に加え、析出した沈殿物を集め減圧下乾燥して、10.8mgのガラクトース導入N-アセチルカルボキシメチルキトサン-デアミノチロシン-Gly-Phe-Phe-MTX複

合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量を、紫外部(308nm)の吸光度分析から求めたところ12.1%(重量%)であった。また、本複合体におけるペプチドに対するMTXのモル比は、0.96と算出された。

[0168] 実施例21

(1) 化合物21-1の合成

特願平1-180897号に記載の方法に従つて合成した。

[0169] (2) 化合物21-2の合成

化合物21-1(20.0g)をメタノール(80mL)に溶解し、ジブチルスズオキシド(21.4g)を加え、2時間加熱還流した。溶媒を減圧下留去し、残渣にベンゼン(160mL)、バラメトキシベンジルクロライド(28mL)およびテトラ-n-ブチルアンモニウムプロミド(23.0g)を加え、1.5時間加熱還流した。

[0170] 次いで反応液を室温に戻した後、メタノール(160mL)および28%ナトリウムメトキシド-メタノール溶液(80mL)を加え、室温下で1時間攪拌した。反応液より析出物を濾別した後、濾液を酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水にて洗浄し、次いで乾燥して溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲル(900g)を用いるカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン-酢酸エチル-メタノール300:400:7)で精製することにより、化合物21-2(18.8g)を無色結晶として得た。

[0171] $[\alpha]_{D}^{20} = -8.9^{\circ}$ (c 1.03, C HCl_{1s})

IR (CHCl_{1s}) : 3332 cm⁻¹
¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.30 (2H, A₂B₂, J = 8.3Hz)、6.90 (2H, A₂B₂, J = 8.3Hz)、4.68 (2H, s)、4.26 (1H, d, J = 7.8Hz)、4.02 (1H, m), 3.98 (1H, br, s)、3.96 (1H, dd, J = 11.7, 6.3Hz)、3.82 (1H, m)、3.81 (3H, s)、3.74 (1H, dd, J = 9.5, 7.8Hz)、3.59 (1H, m)、3.49 (1H, t-like)、3.42 (1H, d, J = 9.5, 3.4Hz)、1.07-0.95 (2H, m)、0.02 (9H, s)。

[0172] (3) 化合物21-3の合成

化合物21-2(4.45g)を溶解したピリジン(40mL)溶液に無水酢酸(20mL)を加え、室温下で12時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣を酢酸エチルで希釈した後、2%塩酸および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄し、次いで乾燥して溶媒を減圧下留去した(5.47g)。続いて、得られた残渣(5.47g)を塩化メチレン(100mL)溶液に溶解した後、水(5mL)および2,3-ジクロロ-5,6-ジ

45

シアノ-p-ベンゾキノン (DDQ、7.56 g) を加え、室温下で30分間攪拌した。反応液を塩化メチレンで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウムにて洗浄し、次いで乾燥して溶媒を減圧下留去した。得られた残渣をシリカゲル (330 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン-酢酸エチル 3:2) で精製することにより化合物21-3 (4.20 g) を無色粉末として得た。

[0173] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.31 (1H, d, $J=3.4\text{ Hz}$)、4.93 (1H, d, $J=10.0, 7.8\text{ Hz}$)、4.43 (1H, d, $J=7.8\text{ Hz}$)、4.19-4.10 (2H, m)、3.98 (1H, m)、3.84-3.78 (2H, m)、3.55 (1H, m)、2.48 (1H, br, d)、2.16、2.11、2.04 (each 3H, s)、0.98 (1H, ddd, $J=14.0, 10.5, 6.8\text{ Hz}$)、0.89 (1H, ddd, $J=14.0, 10.0, 5.1\text{ Hz}$)、0.00 (9H, s)。

[0174] (4) 化合物21-4の合成

化合物21-3 (13.8 g) が溶解した塩化メチレン (90m1) 溶液に、ビリジン (16m1) および塩化クロロアセチル (5.40m1) を加え、室温下で30分間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈した後、2% 塩酸および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄し、次いで乾燥して溶媒を減圧下留去した。得られた残渣をシリカゲル (330 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン-酢酸エチル 3:1) で精製することにより化合物21-4 (15.0 g) を無色粉末として得た。

[0175] $[\alpha]_{D}^{20} -8.8^\circ$ (c 1.14, CHCl_3)

$\text{IR}(\text{CHCl}_3)$: 1753 cm^{-1}
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.39 (1H, d, $J=3.4, 1.0\text{ Hz}$)、5.23 (1H, d, $J=10.5, 8.1\text{ Hz}$)、5.08 (1H, d, $J=10.5, 3.4\text{ Hz}$)、4.51 (1H, d, $J=8.1\text{ Hz}$)、4.22 (1H, dd, $J=1.2, 6.3\text{ Hz}$)、4.14 (1H, dd, $J=1.2, 7.1\text{ Hz}$)、4.00 (1H, m)、3.97 (2H, s)、3.95 (1H, t like)、3.58 (1H, m)、2.16、2.06、2.05 (each 3H, s)、0.99 (1H, ddd, $J=13.9, 10.7, 6.6\text{ Hz}$)、0.92 (1H, dd, $J=13.9, 10.3, 5.1\text{ Hz}$)、0.02 (9H, s)。

[0176] (5) 化合物21-5の合成

化合物21-4 (3.55 g) を塩化メチレン (30m1) に溶解し、三フッ化ホウ素ジエルニーテル錯体 (3.62m1) を加え0℃で5時間攪拌した。反応液

10

を塩化メチレンに希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、乾燥後溶媒を減圧下留去した。得られた残渣をシリカゲル (150 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン-酢酸エチル 3:2) で精製することにより化合物21-5 (2.52 g) を無色粉末として得た。

$\text{IR}(\text{CHCl}_3)$: 1747 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2- (トリメチルシリル)-エチル基が除去されていることを確認した。

[0177] (6) 化合物21-6の合成

化合物21-5 (8.27 g) を塩化メチレン (50m1) に溶解し、トリクロロアセトニトリル (12.5m1)、1,8-ジアザビシクロ [5.4.0] -7-ウニデンゼン (323 μ l) を順次加えて、0℃で30分攪拌した。反応液は減圧下濃縮した後、シリカゲル (450 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン-酢酸エチル 3:1) で精製し、化合物21-6 (9.10 g) 無色粉末として得た。

[0178] $[\alpha]_{D}^{20} +103.8^\circ$ (c 0.9

8, CHCl_3)

$\text{IR}(\text{CHCl}_3)$: 1753, 1676 cm^{-1}
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.69 (1H, s)、6.62 (1H, d, $J=3.4\text{ Hz}$)、5.56 (1H, m)、5.50 (1H, dd, $J=10.7, 3.2\text{ Hz}$)、5.41 (1H, dd, $J=10.7, 3.4\text{ Hz}$)、4.45 (1H, t like)、4.18 (1H, dd, $J=11.2, 6.8\text{ Hz}$)、4.10 (1H, dd, $J=11.2, 6.6\text{ Hz}$)、4.01 (2H, s)、2.18、2.04、2.03 (each 3H, s)。

[0179] (7) 化合物21-7の合成

モレキュラーシーブズ4A (3 g) を含む塩化メチレン (8m1) 溶液に化合物21-6 (1.24 g) および化合物10-1 (480 mg) を溶解し、室温で2時間攪拌した後、0℃で三フッ化ホウ素ジエルニーテル錯体 (9.7 μ l) を加え、同温度で2時間攪拌した。反応液を濾過した後、濾液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、乾燥後溶媒を減圧下留去した。得られた残渣を、シリカゲル (120 g) を用いるカラムクロマトグラフィー (トルエン-アセトニーメタノール 200:100:6) により精製して、化合物21-7 (395 mg) を無色非晶質として得た。

[0180] $[\alpha]_{D}^{20} -27.9^\circ$ (c 0.97, CHCl_3)

$\text{IR}(\text{CHCl}_3)$: 2108, 1753, 1676 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.41-7.22 (20H, m)、6.01 (1H, d, $J=7.3\text{ Hz}$)、5.22 (1H, d, $J=3.2\text{ Hz}$)、5.14 (1H, d, $J=3.7\text{ Hz}$)、5.01 (1H, d, 50

47

d, J=10. 3, 8. 1 Hz)、4. 96(4. 7
5, 4. 73, 4. 40 (each 1H, d, J=1
2. 0 Hz)、4. 90 (1H, d, J=7. 1 H
z)、4. 83 (2H, d like)、4. 79 (1
H, dd, J=10. 3, 3. 4 Hz)、4. 78,
4. 69 (each 1H, d, J=11. 7 Hz)、
4. 55 (1H, d, J=8. 3 Hz)、4. 46 (1
H, q, J=6. 3 Hz)、4. 17 (1H, dd, J
=8. 3, 8. 1 Hz)、4. 15-4. 08 (2H,
m)、3. 98 (1H, dd, J=11. 7, 5. 9 H
z)、3. 96 (1H, dd, J=8. 3, 8. 1 H
z)、3. 93 (2H, s)、3. 91-3. 85 (2
H, m)、3. 81-3. 76 (2H, m)、3. 69
-3. 55 (2H, m)、3. 48-3. 43 (2
H, m)、3. 37 (2H, t, J=5. 1 Hz)、
2. 01, 2. 00, 1. 83, 1. 77 (each
3H, s)、1. 17 (3H, d, J=6. 3 Hz).

【0181】(S) 化合物21-8の合成

化合物21-7 (210 mg) が溶解したエタノール
(4 ml) - 塩化エチレン (1 ml) 溶液に、チオウレ
ア (58 mg) および2, 6-ルチジン (35. 5 μ
l) を加え、60°Cで1時間攪拌した後、反応液を塩化
メチレンに希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗
浄し、乾燥後溶媒を減圧下留去した。得られた残渣をシリカゲル (40 g) を用いるカラムクロマトグラフィー
(塩化メチレン-メタノール 40:1) で精製することにより化合物21-8 (162 mg) を無色非晶質と
して得た。

【0182】 $[\alpha]_D^{20} -29. 6^\circ$ (c 1. 06,
CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 2108, 1747, 1676 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7. 41-7. 24
(20H, m)、6. 05 (1H, d, J=7. 3 H
z)、5. 19 (1H, d, J=3. 4 Hz)、5. 1
4 (1H, d, J=3. 7 Hz)、4. 95, 4. 8
2, 4. 70, 4. 68 (each 1H, d, J=1
1. 7 Hz)、4. 90 (1H, d, J=7. 3 H
z)、4. 83, 4. 78, 4. 74, 4. 42 (ea
ch 1H, d, J=12. 0 Hz)、4. 76 (1
H, t like)、4. 53 (1H, d, J=8. 1 H
z)、4. 46 (1H, q, J=6. 3 Hz)、4. 1
7 (1H, dd, J=8. 3, 8. 1 Hz)、4. 14
-4. 10 (2H, m)、3. 96 (1H, m)、3.
95 (1H, dd, J=8. 3, 8. 1 Hz)、3. 9
3 (1H, m)、3. 87 (1H, dt, J=11.
2, 4. 4 Hz)、3. 85 (1H, dd, J=10.
7, 3. 2 Hz)、3. 79 (1H, dd, J=10.
7, 3. 2 Hz)、3. 68-3. 48 (2H,
m)、2. 38 (1H, br. s)、2. 08, 2. 0

48

2, 1. 92, 1. 76 (each 3H, s)、1.
14 (3H, d, J=6. 3 Hz)。

【0183】(9) 化合物21-9の合成

化合物21-8 (373 mg) を溶解したジメチルホル
ムアミド (5 ml) 溶液に、三酸化硫黄ピリジン錯体
(398 mg) を加え、55°Cで1時間攪拌した。反応
液を濃縮した後、メタノール (5 ml) に溶解し、陽イ
オン交換樹脂 (Dowex 50W Na⁺) を加え3
0分間攪拌した。不溶を滤去し、濾液を減圧下濃縮した
後、得られた残渣をシリカゲル (30 g) を用いるカラ
ムクロマトグラフィー (塩化メチレン:メタノール
8:1) にて精製することにより化合物21-9 (25
2 mg) を無色非晶質として得た。

【0184】 $[\alpha]_D^{20} -38. 2^\circ$ (c 0. 97,

CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 3450, 2110, 1747,
1670 cm⁻¹

¹H-NMR (CDOD₃) δ : 7. 44-7. 22
(20H, m)、5. 54 (1H, d, J=3. 7 H
z)、5. 33 (1H, d, J=3. 7 Hz)、5. 0
0 (1H, dd, J=10. 0, 8. 3 Hz)、4. 8
7, 4. 68, 4. 54 (each 1H, d, J=1
1. 5 Hz)、4. 81, 4. 79, 4. 71, 4. 5
5 (each 1H, d, =12. 0 Hz)、4. 76
(1H, d like)、4. 76 (1H, m)、4. 6
7 (1H, d, J=8. 3 Hz)、4. 45 (1H,
d, J=8. 1 Hz)、4. 37 (1H, dd, J=1
0. 0, 3. 7 Hz)、4. 17 (1H, dd, J=1
1. 0, 8. 1 Hz)、4. 04-3. 91 (7H,
m)、3. 90 (1H, dd, J=11. 0, 6. 1 H
z)、3. 82 (1H, m)、3. 75 (1H, br.
d)、3. 71-3. 56 (2H, m)、3. 46
(1H, m)、3. 38 (2H, t like)、2. 0
6, 2. 00, 1. 99, 1. 94 (each 3H,
s)、1. 22 (3H, d, J=6. 6 Hz)。

【0185】(10) 化合物21-10の合成

化合物21-9 (160 mg) を2%ナトリウムメトキ
シド-メタノール溶液 (3. 5 ml) に溶解した後、室
温下で30分間攪拌した。水 (0. 5 ml) およびドラ
イアイスを加えて10分間攪拌した後、反応液を濃縮
し、次いで残渣を高分子ゲル (200 cc) を用いるカラ
ムクロマトグラフィー (メタノール) で精製すること
により化合物21-10 (130 mg) を無色粉末とし
て得た。

【0186】 $[\alpha]_D^{20} -54. 8^\circ$ (c 0. 98,
CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 3450, 2106, 1668 cm⁻¹

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 7. 42-7. 22
(20H, m)、5. 36 (1H, d, J=3. 9 H

50

49

z)、4. 89-4. 81 (6H, m)、4. 77 (1H, d, J=11. 7Hz)、4. 64 (1H, d, J=12. 0Hz)、4. 57-4. 54 (3H, m)、4. 48 (1H, d, J=7. 8Hz)、4. 41 (1H, d, J=8. 3Hz)、4. 16 (1H, dd, J=9. 3, 9. 3Hz)、4. 13-4. 06 (4H, m)、4. 00-3. 91 (4H, m)、3. 79 (1H, m)、3. 71-3. 55 (24H, m)、3. 53 (1H, m)、3. 33 (2H, t, J=5. 1Hz)、2. 01 (3H, s)、1. 15 (3H, d, J=6. 6Hz)。

【0187】(11) 化合物21-11の合成

化合物21-10 (20mg) が溶解したメタノール (4m1) 溶液に、パラジウム-炭素 (10%、40m

g) および1N塩酸 (34μl) を加え、水素気流下 (1atm)、室温下で2時間攪拌した。反応液より触媒を濾別した後、濾液を濃縮し、残渣をシリカゲル

(1. 2g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン:メタノール:水:5:5:1) で精製することにより化合物21-11 (10mg) を無色粉末として得た。

【0188】 $[\alpha]_D^{25} -56. 6^\circ$ (c 0. 33, MeOH)

IR (KBr) : 3418, 1675 cm⁻¹

¹H-NMR (CD₃OD) δ: 5. 05 (1H, d, J=3. 9Hz)、4. 81 (1H, m)、4. 57 (1H, d, J=7. 6Hz)、4. 44 (1H, d, J=8. 3Hz)、4. 21 (1H, dd, J=9. 5, 3. 2Hz)、4. 19 (1H, br. d)、4. 05 (1H, dd, J=10. 0, 8. 3Hz)、4. 04-3. 99 (4H, m)、3. 93 (1H, dd, J=9. 3, 9. 3Hz)、3. 91 (1H, dd, J=12. 0, 2. 4Hz)、3. 84 (1H, dd, J=10. 5, 3. 4Hz)、3. 82 (1H, m)、3. 80 (1H, dd, J=9. 3Hz, 9. 3Hz)、3. 79-3. 62 (23H, m)、3. 49 (1H, m)、3. 42 (1H, m)、3. 22 (1H, ddd, J=13. 5, 6. 1, 4. 4Hz)、3. 16 (1H, ddd, J=13. 5, 5. 6, 4. 4Hz)、1. 98 (3H, s)、1. 16 (3H, d, J=6. 6Hz)。

【0189】(12) 硫酸化ルイスX修飾CMブラン (化合物21) の合成

カルボキシメルブラン (30mg) および化合物21-11 (67. 5mg) を溶解した水 (1. 3m1) およびN, N'-ジメチルホルムアミド (1. 3m1) の混合溶液に、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン (366mg) と炭酸水素ナトリウム (6. 5mg) を加え、40°Cで110時間攪拌した後、炭酸水素ナトリウム (13mg) を更に加

50

え、反応液を濃縮した。反応混合物を99. 5%エタノール (35m1) に加えて粗目的物を析出させた後、その析出物を95%エタノール (40m1×3回)、アセトン (40m1)、ジエチルエーテル (40m1) の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥した。

【0190】続いて、粗生成物を10m1の水に溶解した後、透析膜 (スペクトラ/ボア社製: 分子量排除限界 12000~14000) を用いて、精製水 (10000m1) を外液として室温下で16時間透析し、透析内液を減圧下で凍結乾燥することにより硫酸化ルイスX修飾カルボキシメルブラン (化合物21、28mg、d.s.: 0. 03) を得た。

【0191】実施例22

(1) 化合物22-1の合成

化合物21-2 (2. 78g) を溶解したビリジン (20m1) 溶液にベンゾイルクロリド (20m1) を加え、室温下で12時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣を酢酸エチルで希釈した後、2%塩酸および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄し、次いで乾燥して溶媒を減圧下留去した。続いて、得られた残渣をシリカゲル (330g) を用いるカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン-酢酸エチル 6:1) で精製することにより化合物22-1 (4. 92g) を無色粉末として得た。

【0192】 $[\alpha]_D^{25} +65. 9^\circ$ (c 1. 10, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 1724 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8. 27, 8. 14, 8. 05 (each 2H, d like)、7. 71-7. 65 (4H, m)、7. 59-7. 52 (6H, m)、7. 12 (1H, d, J=8. 8Hz)、6. 68 (1H, d, J=8. 8Hz)、5. 97 (1H, dd, J=3. 4, 1. 0Hz)、5. 58 (1H, dd, J=10. 0, 8. 1Hz)、4. 71 (1H, d, J=8. 1Hz)、4. 71, 4. 51 (each 1H, d, J=12. 7Hz)、4. 70 (1H, m), 4. 53 (1H, dd, J=10. 9, 6. 1Hz)、4. 16 (1H, t like)、4. 08 (1H, m), 3. 86 (1H, dd, J=10. 0, 3. 4Hz), 3. 80 (3H, s)、3. 66 (1H, m)、1. 02 (1H, ddd, J=13. 9, 11. 0, 6. 6Hz)、0. 95 (1H, ddd, J=13. 9, 10. 5, 5. 4Hz)、-0. 01 (9H, s)。

【0193】(2) 化合物22-2の合成

化合物22-1 (4. 20g) が溶解した塩化メチレン (60m1) 溶液に、水 (3m1) および2, 3-ジクロロ-5, 6-ジシアノ-p-ベンゾキノン (DDQ、4. 02g) を加え、室温下で5時間攪拌した。反応液を塩化メチレンで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウムにて

51

洗浄し、次いで乾燥して溶媒を減圧下留去した。得られた残渣をシリカゲル(150g)を用いるカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン-酢酸エチル4:1)で精製することにより化合物22-2(4.20g)を無色粉末として得た。

【0194】 $[\alpha]_D^{20} -1.2^\circ$ (c 1.00, CHCl₃)
 IR (CHCl₃) : 3520, 1726 cm⁻¹
¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.18-8.16 (2H, m), 8.07-8.03 (4H, m), 7.63-7.55 (3H, m), 7.51-7.42 (6H, m), 5.77 (1H, d, J = 3.4 Hz), 5.35 (1H, dd, J = 10.0, 7.8 Hz), 4.74 (1H, d, J = 7.8 Hz), 4.60 (1H, dd, J = 11.2, 7.1 Hz), 4.44 (1H, dd, J = 11.2, 6.1 Hz), 4.15 (1H, t like), 4.12 (1H, m), 4.04 (1H, m), 3.65 (1H, m), 2.73 (1H, m), 0.99 (1H, dd, J = 13.9, 11.0, 6.6 Hz), 0.92 (1H, dd, J = 13.9, 10.5, 5.3 Hz), -0.06 (9H, s)。

【0195】 (3) 化合物22-3の合成

化合物22-2(4.15mg)が溶解した塩化メチレン(1.5ml)溶液に、ピリジン(300μl)および塩化クロロアセチル(112μl)を加え、室温下で30分間攪拌した。反応液を塩化メチレンで希釈した後、1%塩酸および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄し、次いで乾燥して溶媒を減圧下留去した(5.47g)。得られた残渣をシリカゲル(30g)を用いるカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン-酢酸エチル6:1)で精製することにより化合物22-3(4.34mg)を無色油状物として得た。

【0196】 $[\alpha]_D^{20} +30.6^\circ$ (c 1.06, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 1770, 1720 cm⁻¹
¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.15 (2H, d like), 8.01-7.99 (4H, m), 7.63 (1H, t like), 7.60-7.55 (2H, m), 7.51 (2H, t like), 7.46-7.42 (4H, m), 5.83 (1H, d like), 5.61 (1H, dd, J = 10.3, 8.1 Hz), 5.43 (1H, dd, J = 10.3, 3.4 Hz), 4.77 (1H, d, J = 8.1 Hz), 4.67 (1H, dd, J = 11.2, 6.6 Hz), 4.39 (1H, dd, J = 11.2, 6.8 Hz), 4.25 (1H, t like), 4.04 (1H, ddd, J = 11.0, 9.8, 5.6 Hz), 3.91 (1H, d, J = 15.3 Hz), 3.84 (1H, d, J = 15.3 Hz), 3.64 (1H, m), 0.96 (1H, d,

dd, J = 13.9, 11.0, 6.6 Hz), 0.90 (1H, ddd, J = 13.9, 10.5, 5.6 Hz), -0.067 (9H, s)。

【0197】 (4) 化合物22-4の合成

化合物22-3(4.02mg)を塩化メチレン(5ml)に溶解し、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体(369μl)を加え0℃で5時間攪拌した。反応液を塩化メチレンに希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、乾燥後溶媒を減圧下留去した(3.54mg)。続いて得られた残渣(3.54mg)を塩化メチレン(50ml)に溶解し、トリクロロアセトニトリル(2ml)および炭酸カリウム(41mg)を加えて、室温下で20時間攪拌した。反応液を濾過し、濾液を減圧下濃縮した後、シリカゲル(4.5g)を用いるカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン-酢酸エチル5:1)で精製し、化合物22-4(1.52mg)を無色粉末として得た。

【0198】 $[\alpha]_D^{20} +103.8^\circ$ (c 0.95, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 1770, 1728, 1678 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.63 (1H, s), 8.13 (2H, d like), 7.99-7.96 (4H, m), 7.65 (1H, t like), 7.60-7.50 (4H, m), 7.46-7.40 (4H, m), 6.88 (1H, d, J = 3.7 Hz), 6.01 (1H, m, H-4), 5.88 (1H, dd, J = 10.7, 3.2 Hz), 5.78 (1H, dd, J = 10.7, 3.7 Hz), 4.79 (1H, t like), 4.60 (1H, dd, J = 11.2, 6.8 Hz), 4.40 (1H, dd, J = 11.2, 6.1 Hz), 3.96 (1H, d, J = 15.4 Hz), 3.91 (1H, d, J = 15.4 Hz)。

【0199】 (5) 化合物22-5の合成

化合物1-2(13.8g)を溶解したジメチルホルムアミド溶液(50ml)に、アジ化ナトリウム(3.90g)を加え、70℃で12時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、酢酸エチル(150ml)を加えた後、析出物を濾別し、その濾液を減圧下濃縮した。残渣をシリカゲル(330g)を用いるカラムクロマトグラフィー(塩化メチレン-メタノール25:1)にて精製することにより、化合物22-5(11.5g)を無色油状物として得た。

【0200】 IR (CHCl₃) : 2106 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 3.75-3.63 (2OH, m), 3.62-3.60 (2H, m), 3.39 (2H, t, J = 5.1 Hz)。

【0201】 (6) 化合物22-6の合成

モレキュラーシーブズ4A(1.5g)を含む塩化メチレン(5ml)溶液に化合物22-4(1.40mg)、

化合物22-5 (191mg) を溶解し、室温下で2時間攪拌した後、0℃で三フッ化ホウ素ジエチルニーテル錯体 (51μl) を加え、同温度で5時間攪拌した。反応液を濾過した後、濾液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、乾燥後溶媒を減圧下留去した。得られた残渣を、シリカゲル (35g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン-メタノール 100:1) で精製することにより、化合物22-6 (134mg) を無色非晶質として得た。

【0202】 $[\alpha]_{D}^{25} + 16.5^{\circ}$ (c 1.06, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 2108, 1769, 1730 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.16-8.13 (2H, m)、8.02-7.98 (4H, m)、7.45-7.40 (9H, m)、5.84 (1H, dd, J = 3.4, 1.0 Hz)、5.61 (1H, dd, J = 10.3, 8.1 Hz)、5.44 (1H, dd, J = 10.3, 3.4 Hz)、4.89 (1H, d, J = 8.1 Hz)、4.66 (1H, dd, J = 11.2, 6.6 Hz)、4.38 (1H, dd, J = 11.2, 6.8 Hz)、4.27 (1H, tlike)、4.01 (1H, m)、3.91, 3.86 (each 1H, d, J = 15.4 Hz)、3.82 (1H, m)、3.68-3.58 (14H, m)、3.54-3.51 (2H, m)、3.47-3.43 (2H, m)、3.40-3.31 (4H, m)。

【0203】 (7) 化合物22-7の合成

化合物22-6 (230mg) を溶解したエタノール (3ml) - 塩化エチレン (1ml) 溶液に、チオウレア (106mg) と2,6-ホールチジン (65μl) 加え、60℃で7時間攪拌した後、反応液を塩化メチレンに希釈し、2%塩酸および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、乾燥後溶媒を減圧下留去した。得られた残渣をシリカゲル (20g) を用いるカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン-酢酸エチル-メタノール 20:300:5) で精製することにより化合物22-7 (160mg) を無色非晶質として得た。

【0204】 $[\alpha]_{D}^{25} - 0.9^{\circ}$ (c 1.07, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 2108, 1724 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.16, 8.08, 8.04 (each 2H, dlike)、7.62, 7.59, 7.57 (each 2H, tlike)、7.49, 7.46, 7.44 (each 2H, tlike)、5.78 (1H, d, J = 3.2 Hz)、5.37 (1H, dd, J = 9.8, 7.8 Hz)、4.87 (1H, d, J = 7.8 Hz)、4.60 (1H, dd, J = 11.5, 6.8 Hz)、4.43 (1H, dd, J = 11.5, 6.3 Hz)、4.19-

4.14 (2H, m)、4.00 (1H, m)、3.84 (1H, m)、3.67-3.58 (14H, m)、3.57-3.54 (2H, m)、3.53-3.50 (2H, m)、3.46-3.43 (2H, m)、3.35 (2H, t, J = 5.1 Hz)、2.88 (1H, d, J = 6.0 Hz)。

【0205】 (8) 化合物22-8の合成

化合物22-7 (140mg) を溶解したジメチルホルムアミド (3ml) 溶液に、三酸化硫黄ビリジン錯体 (75mg) を加え、45℃で12時間攪拌した。反応液を濃縮した後、メタノール (3ml) に溶解し、陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W Na⁺) を加え30分間攪拌した。不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮した後、得られた残渣をシリカゲル (20g) を用いるカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン-メタノール 8:1) で精製することにより化合物22-8 (81mg) を無色非晶質として得た。

【0206】 $[\alpha]_{D}^{25} + 38.3^{\circ}$ (c 0.70, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 2108, 1724 cm⁻¹

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8.14-8.11 (4H, m)、8.00 (2H, dlike)、7.65, 7.60, 7.58 (each 2H, tlike)、7.52, 7.47, 7.42 (each 2H, tlike)、6.11 (1H, d, J = 3.2 Hz)、5.57 (1H, dd, J = 10.3, 8.1 Hz)、4.97 (1H, d, J = 8.1 Hz)、4.95 (1H, dd, J = 10.3, 3.4 Hz)、4.49-4.45 (2H, m)、4.39 (1H, tlike)、3.96 (1H, dd, J = 11.7, 4.2 Hz)、3.77 (1H, dd, J = 11.7, 4.9 Hz)、3.67-3.55 (14H, m)、3.51-3.48 (2H, m)、3.45-3.41 (2H, m)、3.39-3.33 (4H, m)。

【0207】 (9) 化合物22-9の合成

化合物22-8 (70mg) を3%ナトリウムメトキシド-メタノール溶液 (2ml) に溶解した後、室温下で30分間攪拌した。水 (0.2ml) とドライアイスを加えて、10分間攪拌した後、反応液を濃縮し、次いで残渣を高分子ゲル (90cc) を用いるカラムクロマトグラフィー (メタノール) で精製することにより化合物22-9 (45mg) を無色非晶質として得た。

【0208】 $[\alpha]_{D}^{25} - 7.4^{\circ}$ (c 0.31, CHCl₃)

IR (CHCl₃) : 3450, 2108 cm⁻¹

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 4.41 (1H, d, J = 7.8 Hz)、4.27 (1H, dd, J = 9.8, 2.9 Hz)、4.19 (1H, br-s)、4.06 (1H, m)、3.81-3.73 (4H, m)、3.73-3.61 (20H, m)、3.59 (1H,

55

m)、3.43-3.39(2H, m)。

【0209】(10) 化合物22-10の合成
化合物22-9(3.7mg)が溶解したメタノール(7mL)溶液に、パラジウム-炭素(10%、4.0mg)と1N塩酸(1.75μl)を加え、水素気流下(1atm)、室温下で1時間攪拌した。反応液より触媒を濾別した後、濾液を濃縮し、高分子ゲル(90cc)を用いるカラムクロマトグラフィー(メタノール)で精製することにより化合物22-10(3.1mg)を無色粉末として得た。

【0210】 $[\alpha]_{D}^{25} = -3.2^{\circ}$ (c 0.56, MeOH)

¹H-NMR (CD₃OD) δ: 4.42 (1H, d, J=7.8Hz)、4.27 (1H, dd, J=9.8, 3.2Hz)、4.20 (1H, br. d)、4.07 (1H, m)、3.82-3.62 (2.3H, m)、3.61-3.58 (2H, m)、3.22-3.17 (2H, m)。

【0211】(11) ガラクトース-3-硫酸修飾カルボキシメチルフルラン(化合物22)の合成
カルボキシメチルフルラン(3.5mg)と化合物22-10(5.1mg)を溶解した水(1.5mL)とN,

10

20

56

N'-ジメチルホルムアミド(1.5mL)の混合溶液に、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン(EDQ、4.27mg)と炭酸水素ナトリウム(7.5mg)を加え、40℃で110時間攪拌した後、炭酸水素ナトリウム(1.5mg)を更に加え、反応液を濃縮した。反応混合物を9.9.5%エタノール(3.5mL)に加えて粗目的物を析出させた後、その析出物を9.5%エタノール(4.0mL×3回)、アセトン(4.0mL)、ジエチルエーテル(4.0mL)の順で洗浄し、次いで減圧下乾燥した。

【0212】続いて、粗生成物を1.0mLの水に溶解した後、透析膜(スペクトラ/ボア社製:分子量排除限界12000~14000)を用いて、精製水(1.0リットル)を外液として室温下で16時間透析し、透析内液を減圧下で凍結乾燥することによりガラクトース-3-硫酸修飾カルボキシメチルフルラン(化合物22、3.2mg、d.s.:0.10)を得た。

【0213】以上の実施例の化合物を表で示せば下記のとおりである。

【0214】

【表1】

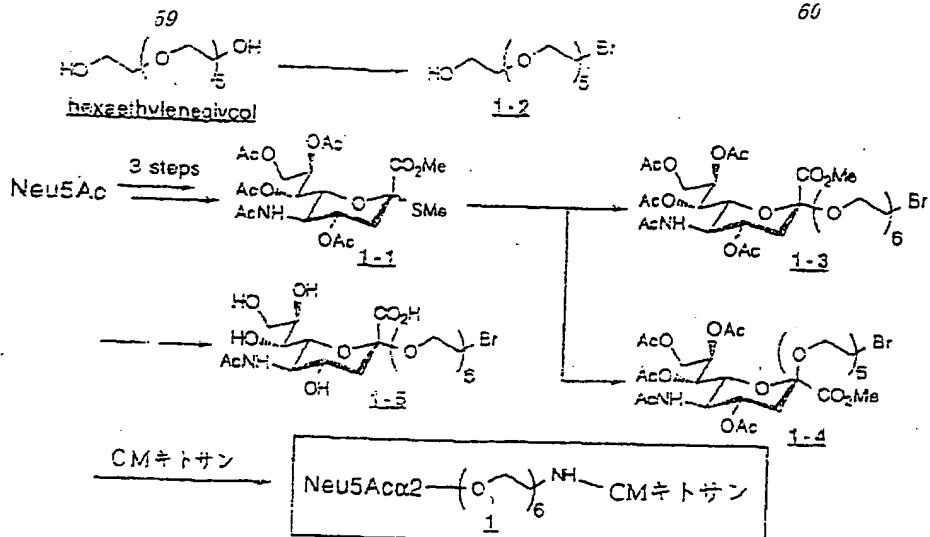
表 1

実験例	E	-O-		T ¹	T ²	P
		m=5	m=5	a β	a β	-NH-
1 N-アセチルノイミン酸						カルボキシメチルキトサン
2 グルコース						カルボキシメチルキトサン
3 マンノース						カルボキシメチルキトサン
4 ガラクトース						カルボキシメチルキトサン
5 フコース						カルボキシメチルキトサン
6 N-アセチルガラクトサミン						カルボキシメチルキトサン
7 シアリルルイスX						カルボキシメチルキトサン
8 シアリル-N-アセチルラクトサミン						カルボキシメチルキトサン
9 N-アセチルノイミン酸						カルボキシメチルフルラン
10 シアリルルイスX						カルボキシメチルフルラン
11 シアリル-N-アセチルラクトサミン						カルボキシメチルフルラン
12 ガラクトース						カルボキシメチルキトサン
13 グルコース						カルボキシメチルキトサン
14 マルトオリース						カルボキシメチルキトサン
15 マルトース						カルボキシメチルキトサン
16 グルコース						カルボキシメチルキトサン
17 N-アセチルグルコサミン						カルボキシメチルキトサン
18 ガラクトース		n=8				カルボキシメチルキトサン
19 ガラクトース		β				ペプチド-MTX
20 ガラクトース		β				カルボキシメチルキトサン
21 硫酸化ルイスX						カルボキシメチルフルラン
22 ガラクトース-3-硫酸						カルボキシメチルフルラン

【0215】また、以上の実施例の合成過程をスキームとして示せば下記のとおりである。

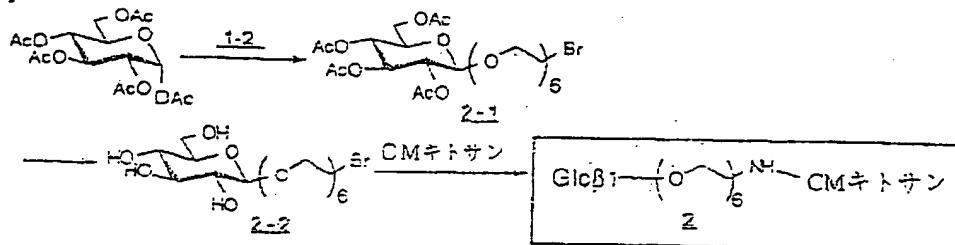
【0216】
【化7】

*Acはアセチル基を表す



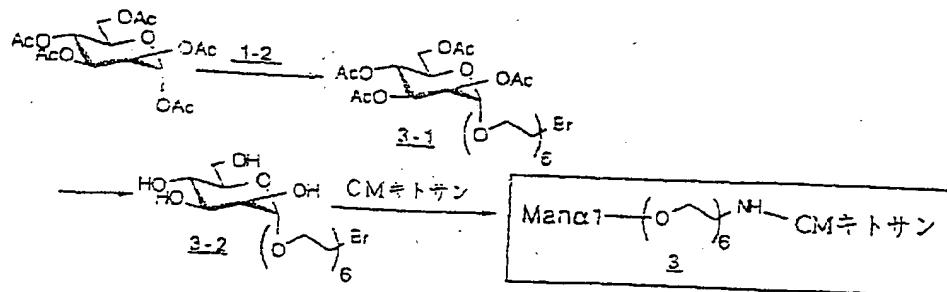
[0217]

【化8】



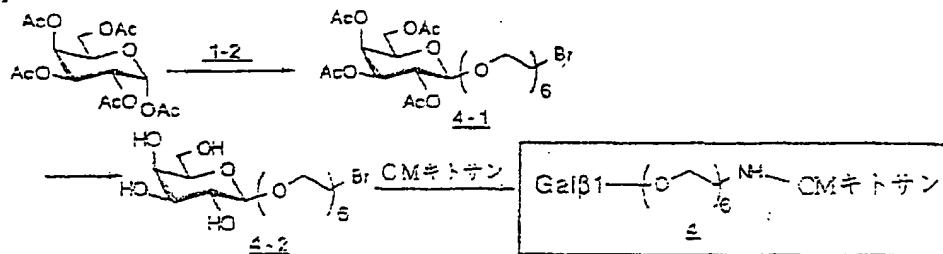
[0218]

【化9】



[0219]

【化10】

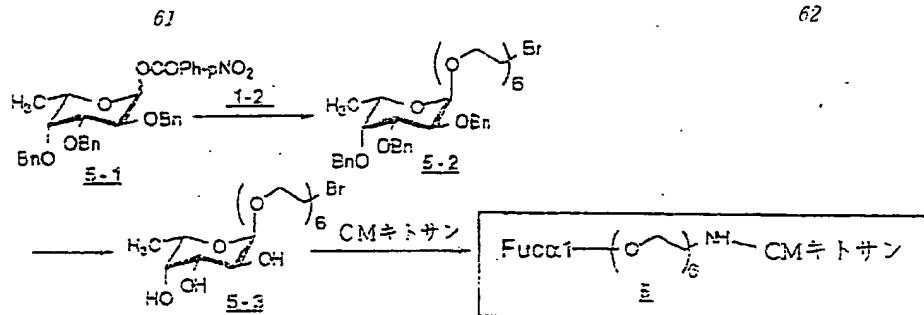


[0220]

【化11】

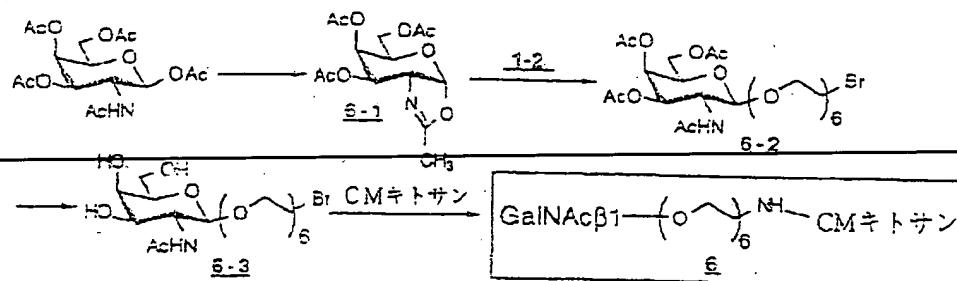
(32)

特開平8-85703



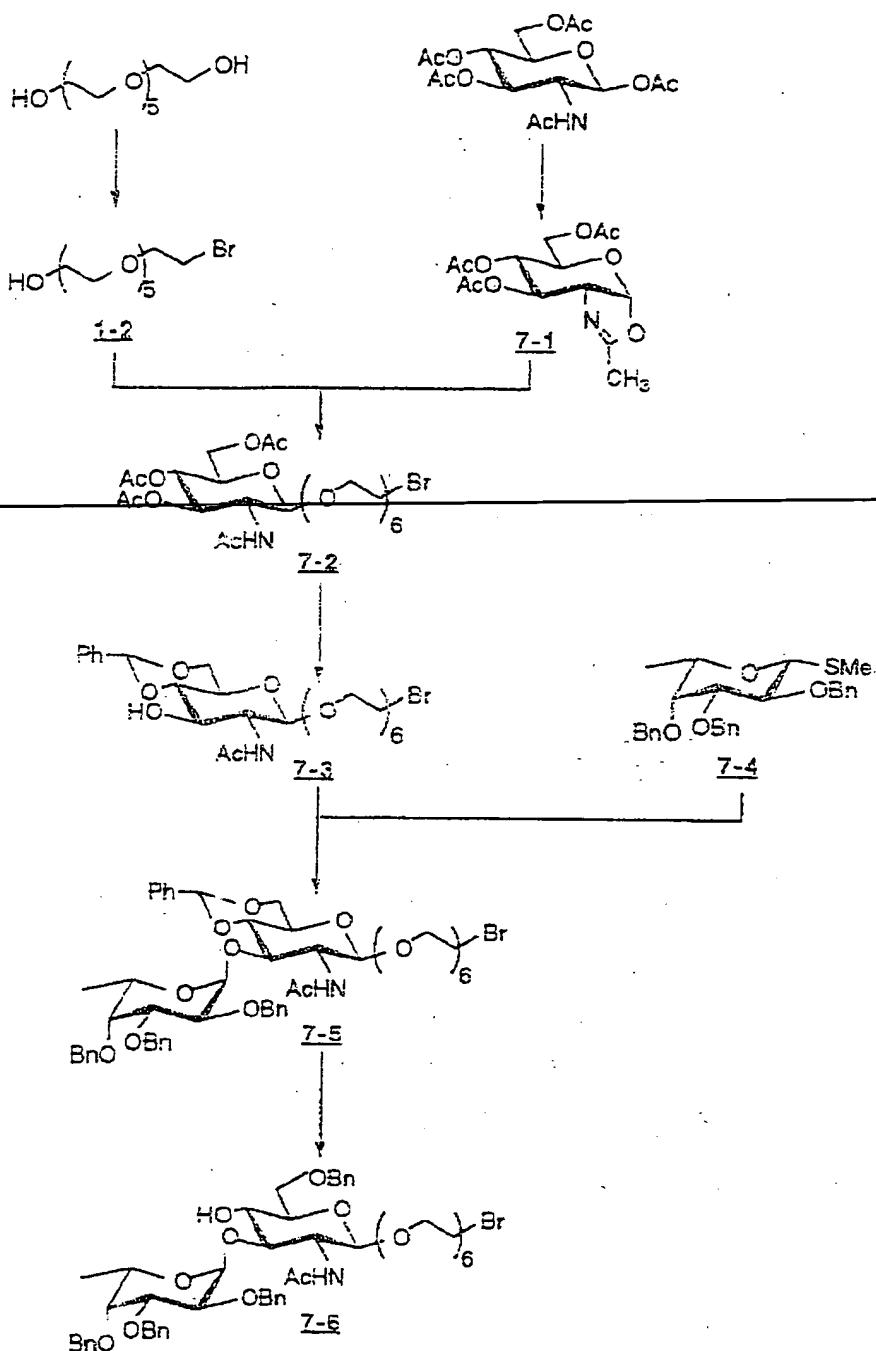
[0221]

[化12]



[0222]

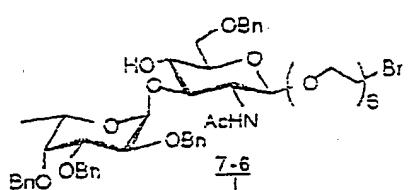
[化13]



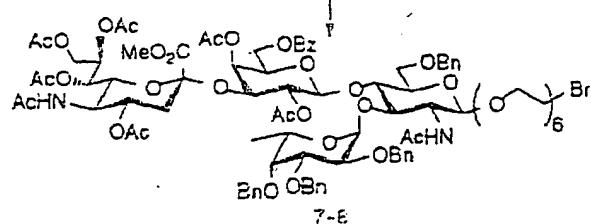
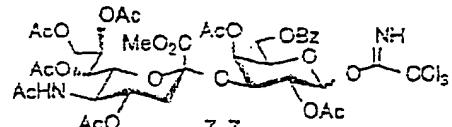
【0223】

【化14】

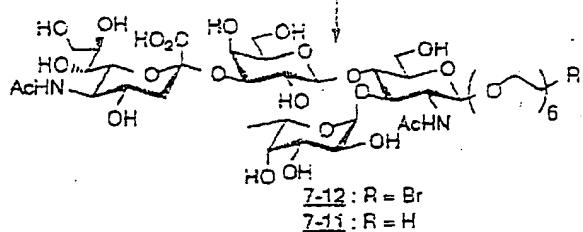
65



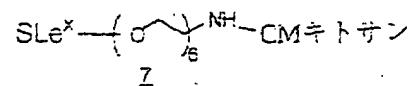
66



7-9 : R = Br
7-10 : R = H



CMキトサン

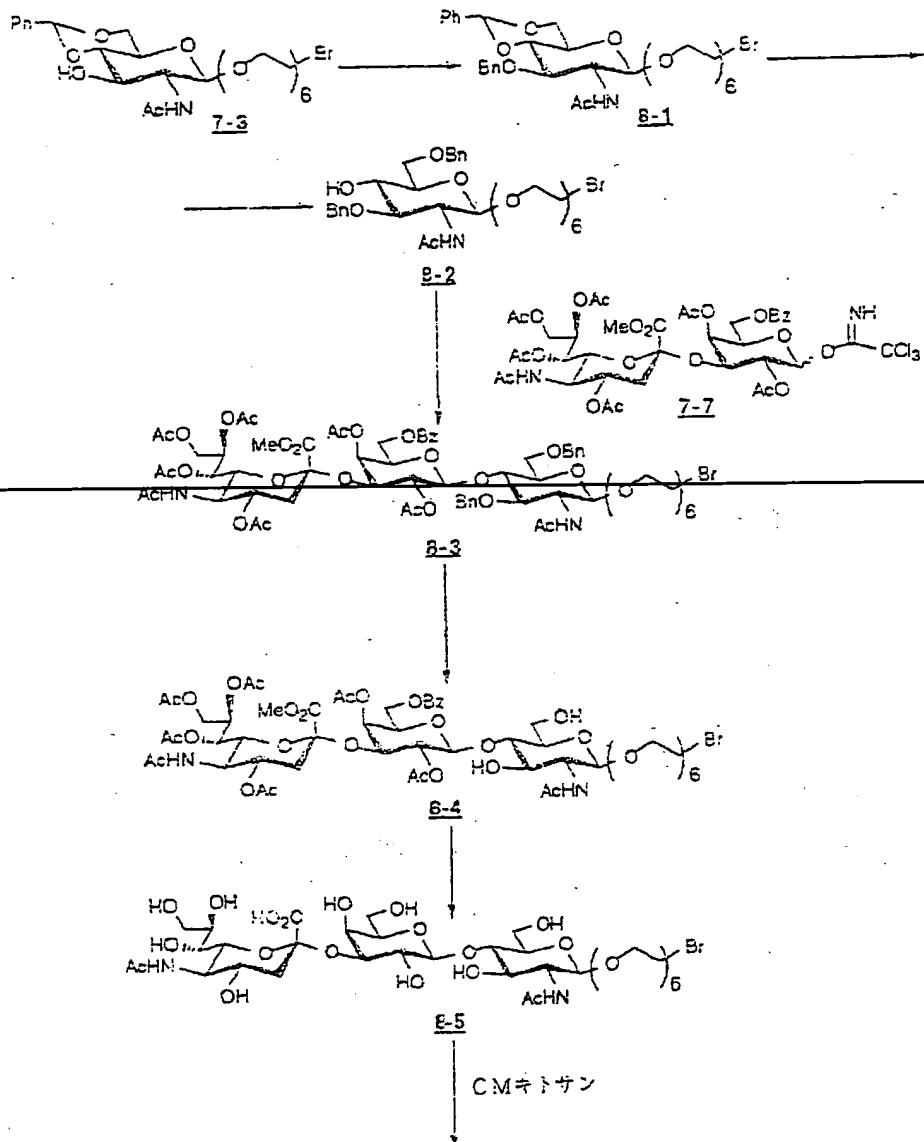


【0224】

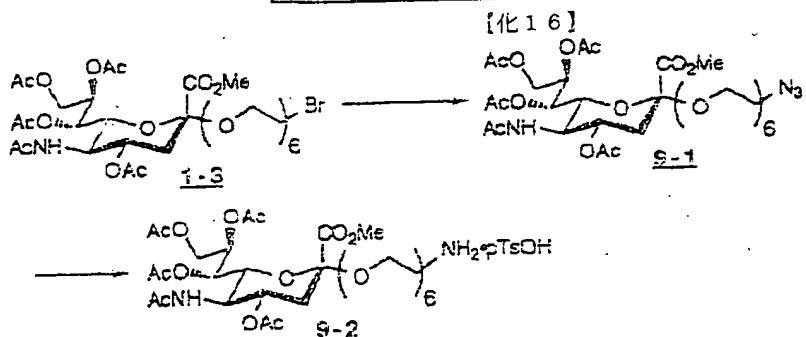
【化15】

67

68



[0225]



CMブルラン

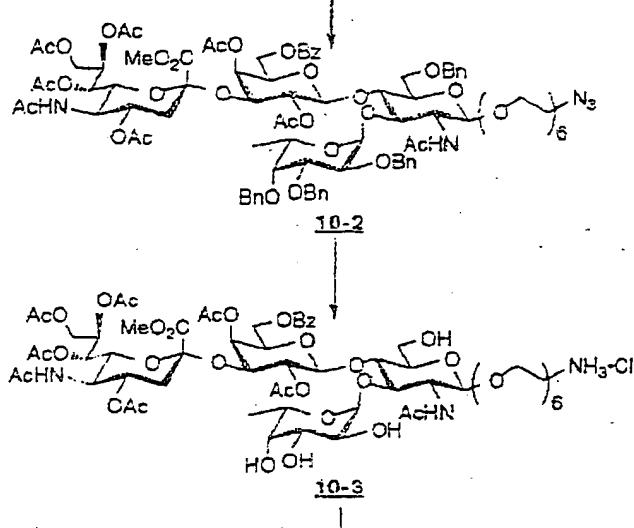
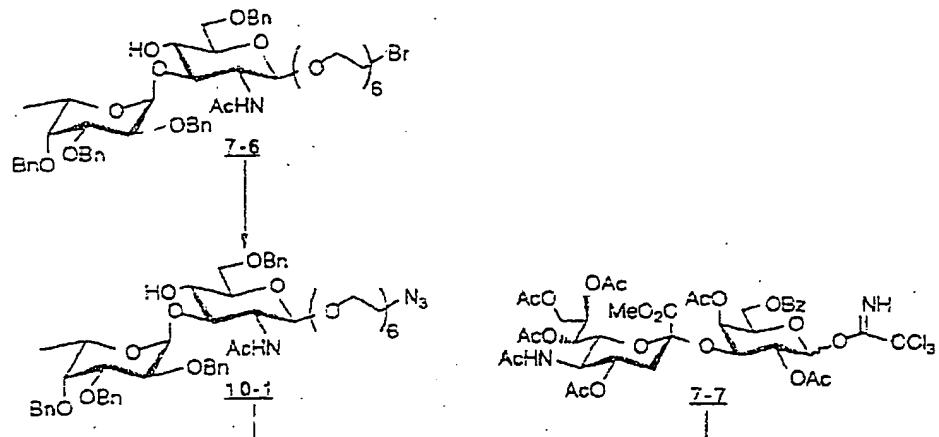
Neu5Ac α 2-(O-)₅NHCO—CM プルラン

69

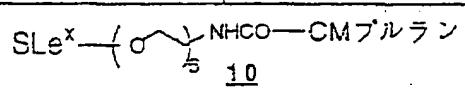
70

[0226]

【化17】

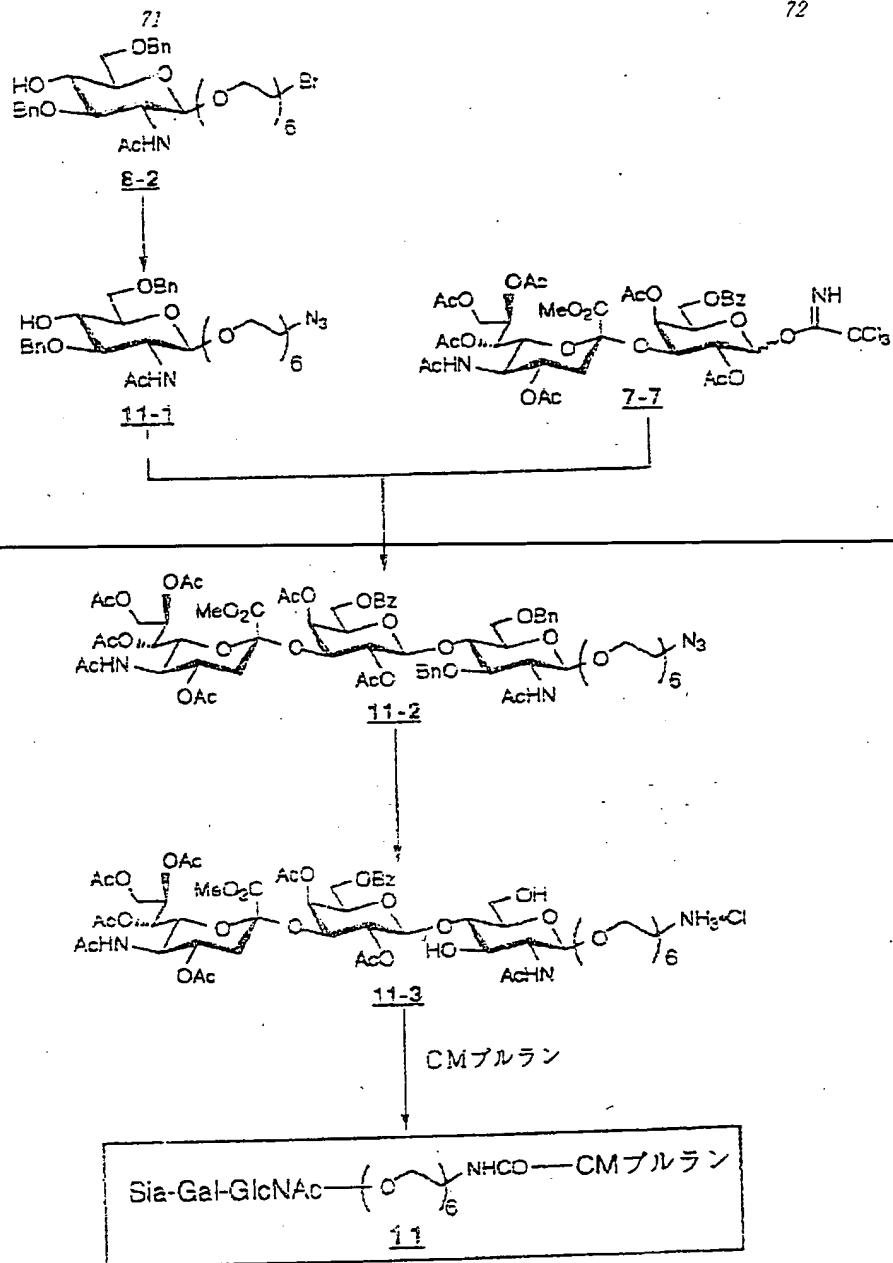


CM プルラン



[0227]

【化18】

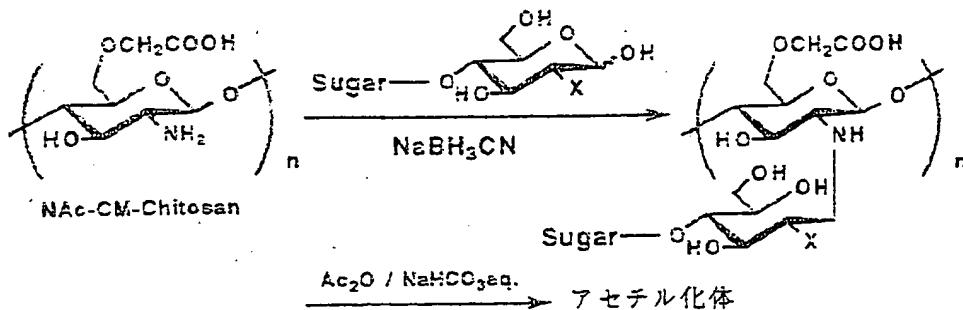


【0228】

【化19】

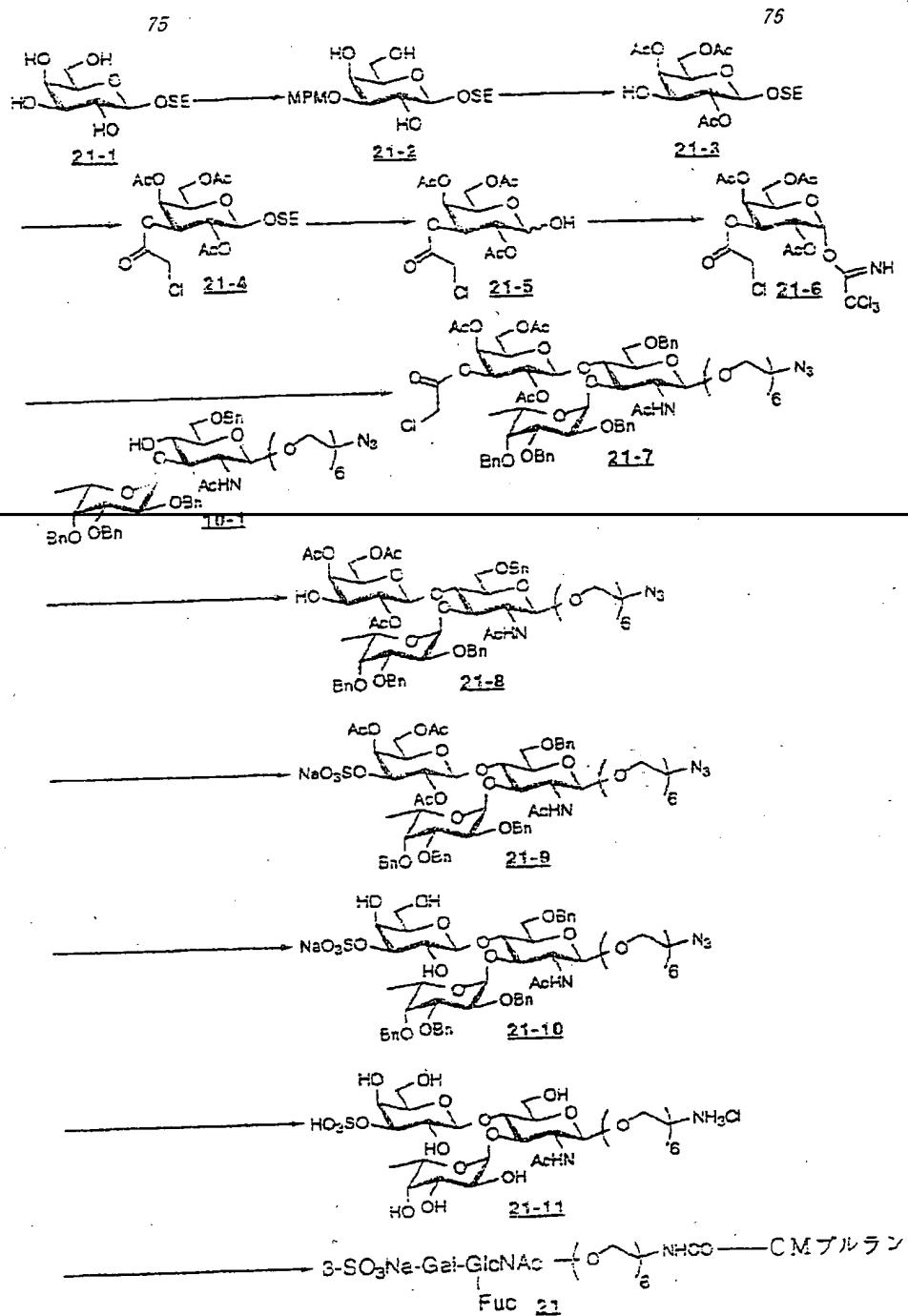
73

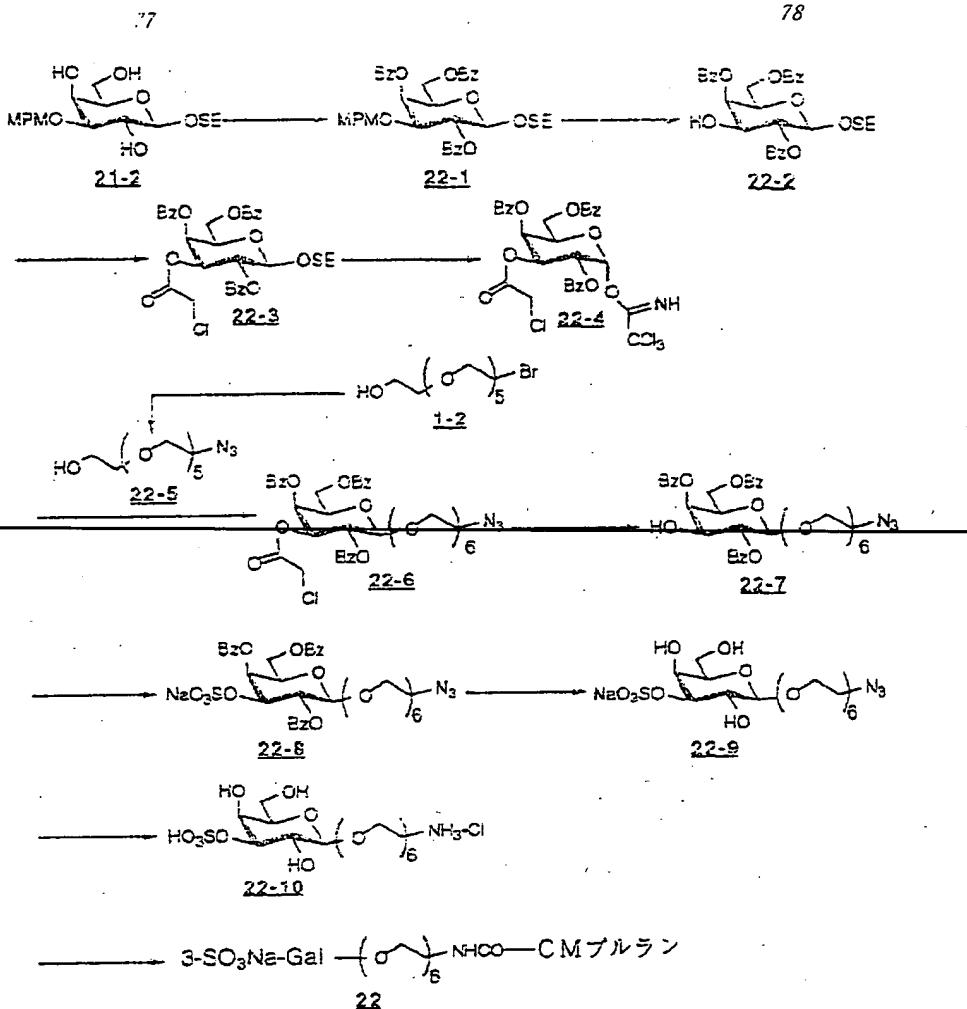
74

実施例 1.2 : X=OH, Sugar =Gal β 1実施例 1.3 : X=OH, Sugar =Glc α 1実施例 1.4 : X=CH, Sugar =Glc α 1-4Glc α 1-4Glc α 1-4Glc α 1実施例 1.5 : X=CH, Sugar =Glc α 1-4Glc α 1実施例 1.6 : X=OH, Sugar =Glc β 1実施例 1.7 : X=NHAc, Sugar =GlcNAc β 1

[0229]

【化20】





【0231】薬理試験

(1) 臓器移向性 (I)

SD系雄性ラット（約200g）の頸静脈より1mg/kgの投与量で³Hラベル化した本発明による化合物を投与した。動物は1群3匹とし、投与後1、2、3分目に頸静脈より約0.2mlの血液を採取し、遠心分離後の血漿を精秤し、サンプルオキシダイヤーで燃焼した。次いで液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、血漿中濃度を算出した。

【0232】本発明による化合物を投与5分後に脱血致死

死させ、主要臓器を摘出した。次いで各臓器を適当な大きさに切り重さを精秤した後、放射活性を測定し、各臓器中濃度を算出した。各臓器の分布クリアランスは、投与5分後の臓器中濃度を5分までの血漿中濃度のAUC（曲線下面積）で割ることによって求めた。本発明による化合物を投与したときの各臓器のクリアランスは表2に示される通りである。

【0233】

【表2】

実施例 (修飾基)	2 (Clc)	3 (Man)	4 (Gal)	5 (Fuc)	6 (GalNAc)	おもきシナセトサツ (none)
脾	0.008 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.009 ± 0.000	0.017 ± 0.001	0.006 ± 0.006	0.009 ± 0.000
筋肉	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.002 ± 0.000
骨髄	0.024 ± 0.002	0.027 ± 0.001	0.022 ± 0.002	0.030 ± 0.000	0.015 ± 0.002	0.022 ± 0.004
肝	0.008 ± 0.000	0.019 ± 0.000	0.067 ± 0.008	0.032 ± 0.001	0.145 ± 0.000	0.007 ± 0.000

単位: μCi/min·g

【0234】(2) 臓器移向性 (II)

ICR系雄性マウス（約20g）の右耳にアセトンに溶

解させたアラキドン酸を塗布し（50mg/mlを20μl）、起炎直後に³¹I標識した本発明による化合物

を尾静脈から $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ になるように投与した。投与後0、5、1、2、4、6時間目に採血し、脱血した後、肺、脾臓、腎臓および肝臓を摘出した。各臓器内における本発明による化合物の濃度は、 γ カウンターで放射活性を測定し求めた。血漿中及び臓器中濃度推移のAUC(曲線下面積)は台形法で求めた。未修飾のカルボ

キシメチルブルランと実施例9および10の化合物の各臓器への移行性は下記表3に示される通りである。特異的な移行性を評価するため、6時間までの各臓器と血漿のAUCの比を比較した。その結果、実施例9の化合物は細網内皮系組織である肝臓および脾臓を回遊した。

【0235】

表 3

(AUC 0-6h, 組織) / (AUC 0-6h, 血漿)

	肺	脾臓	腎臓	肝臓
カルボキシメチルブルラン	0.18	1.99	0.15	1.24
実施例9の化合物	0.11	0.23	0.10	0.25

【0236】(3)炎症部位移向性(I)

炎症部位移行性は、例えば好中球の炎症部位への浸潤の阻害活性によって評価することができ、この好中球の炎症部位への浸潤の阻害活性は、好中球のマーカー酵素であるミエロペルオキシダーゼ(myeloperoxidase:以下「MPO」とする)活性を測定することによって求めることができる(Bradley, P.P. et al. (1982) J. Invest. Dermatol. 78, 206-209)。測定は具体的には以下のようにして行った。

【0237】ICR系雄性マウス(約30g)の右耳にIL-1 β を皮内投与し($2 \text{ng}/20 \mu\text{l}$ 生理食塩水)、2時間後に本発明による化合物(実施例9、10)を適当な濃度で尾静脈内投与した。さらに4時間後右耳の浮腫を起こしている部分をパンチ切断し、測定するまで-80°Cで保存した。パンチ切断した耳介を1mlの5mM EDTAおよび0.5% Cetyltrimethyl ammonium bromideを含む50mM リン酸緩衝液(pH 6.0)中で細かく切り刻んだ後、同じ緩衝液を3mlを加え、Polytronモジナイザーで氷冷下20000rpmで3分間ホモジナイズした。更に、凍結融解を3回繰り返し、各溶解後に氷冷下で10秒間超音波処理した。3000rpmで20分間遠心し、上清をマイクロチューブに移し、再度14000rpmで15分間遠心し、その上清のMPO活性を測定した。MPO活性の測定は96穴のプレートを用いて行ない、上清を2.5ml、3', 5', 5'-テトラメチルベンジンを2

5ml(ジメチルスルホキシドに溶解したものが終濃度で0.16mMになる)、H₂O₂を200ml(0.08Mリン酸緩衝液(pH 5.4)で希釈し、終濃度が0.24mM)の順で加え、37°Cで5分間インキュベートした後、bovine catlaseを25ml(終濃度1.3.6mg/ml)添加し反応を止めた。反応終了後MTT-32マイクロプレートリーダー(コロナ社)で660nmの吸光度を測定した。標準曲線の作製にはヒト白血球由来MPOを用いた。結果は図1に示されるとおりである。

【0238】(4)炎症部位移向性(II)

ICR系雄性マウス(約30g)の右耳にアセトンに溶解させたアラキドン酸を塗布し(50mg/mlを20μl)、起炎直後に³H標識した本発明による化合物(実施例7、10)を尾静脈から $1 \text{mg}/\text{kg}$ になるよう投与した。投与後0、0.8、0.5、1、2、4、6、8、12、24時間目に脱血し、右耳および左耳を摘出した。両耳内濃度は、自動試料燃焼装置を用い、³HをH₂Oとして回収した後、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、本発明による化合物の濃度を求めた。両耳内濃度推移のAUC(曲線下面積)は台形法で求めた。結果は表4に示される通りである。実施例7および10の化合物は、未修飾の多糖に比べ、炎症を起こした右耳へのAUC_{右耳}が有意に増加していた。

【0239】

表 4

検体 AUC 0-24h (% : 投与量 · hr / g · 組織)

右耳(a) 左耳(b) 血漿(b) (a/b)

糖修飾カルボキシメチルキトサン

実施例1の化合物	46.5	8.2	61.4	0.76
実施例7の化合物	126.7	15.4	124.4	1.02

81

82

糖修飾カルボキシメチルフルラン

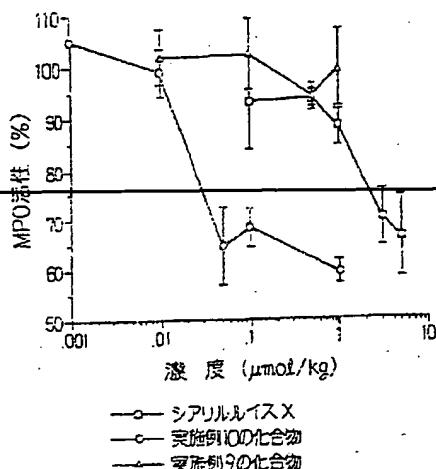
実施例9の化合物	276.8	33.6	588.9	0.47
実施例10の化合物	692.2	24.6	368.4	1.88

【図面の簡単な説明】

した図である。

【図1】本発明による化合物の好中球浸潤阻害活性を示す

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 B 37/08	A	7433-4C		
	Z	7433-4C		
37/10		7433-4C		
// A 6 1 K 31/405	AAH			
31/505	ADU			
31/57	ABE			
31/71				

(72) 発明者 三好詩郎
静岡県三島市安久206-1 田村ハイツ5
号

(72) 発明者 浜名洋
千葉県野田市山崎2694 ビューバレー野田
梅郷A-307号

(72) 発明者 菅原州一
千葉県柏市西柏台2-1-1 シティバラ
ス柏1018

(72) 発明者 井上和泓
千葉県船橋市松ヶ丘5-6-6

(72) 発明者 奥野哲
埼玉県三郷市早稲田8-5-18

(72) 発明者 伊藤照臣
千葉県松戸市新松戸6-89 ライオンズマ
ンション新松戸104

(72) 発明者 川口隆行
東京都豊島区巣鴨1-15-2-A406